



HAL
open science

Développement de radiotraceurs originaux pour l'imagerie TEP des dérégulations du cycle de vie cellulaire en oncologie

Sébastien Beuché

► **To cite this version:**

Sébastien Beuché. Développement de radiotraceurs originaux pour l'imagerie TEP des dérégulations du cycle de vie cellulaire en oncologie. Chimie organique. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASF073 . tel-04426233

HAL Id: tel-04426233

<https://theses.hal.science/tel-04426233>

Submitted on 30 Jan 2024

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.

Développement de radiotraceurs originaux pour l'imagerie TEP des dérégulations du cycle de vie cellulaire en oncologie

Development of original PET radiotracers to image cell cycle
deregulations in oncology

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay

École doctorale n°571 : sciences chimiques : molécules matériaux, instrumentation et
biosystèmes (2MIB)

Spécialité de doctorat : Chimie

Graduate School : Chimie. Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Laboratoire d'Imagerie Biomédicale
Multimodale Paris Saclay (Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Inserm)**, sous la
direction de **Bertrand KUHNAST**, ingénieur-chercheur et le co-encadrement de
Fabien CAILLÉ, ingénieur-chercheur

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 15/11/2023, par

Sébastien BEUCHÉ

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Vincent LEVACHER

Directeur de recherche, Université de Rouen Normandie
(COBRA)

Président

Aurélie MAISONIAL-BESSET

Maîtresse de conférences, HDR, Université de Clermont-
Ferrand

Rapporteur &
Examinatrice

Franck SUZENET

Professeur, Université d'Orléans (ICOA)

Rapporteur &
Examineur

Sandrine LAMANDÉ-LANGLE

Maîtresse de conférences, Université de Lorraine (L2CM)

Examinatrice

Frédéric TARAN

Chef de Service, Université Paris-Saclay, CEA (SCBM)

Examineur

Remerciements

Je tenais à remercier dans un premier temps les membres du jury qui ont accepté de juger ces travaux de thèse, le docteur Aurélie Maisonnial-Besset, maîtresse de conférence à l'université de Clermont-Ferrand, le professeur Franck Suzenet, professeur à l'université d'Orléans, le docteur Sandrine Lamandé-Langle, maîtresse de conférences à l'université de Lorraine, le docteur Vincent Levacher, directeur de recherches à l'université de Rouen-Normandie ainsi que le docteur Frédéric Taran, chef de service du SCBM au CEA.

Merci également au professeur Salvatore Cisternino d'avoir pris le temps de réaliser le suivi de ma thèse durant ces trois dernières années.

Je remercie la Direction de la Recherche Fondamentale du CEA et en particulier le programme CFR TMF pour le financement de cette thèse.

Je remercie également le professeur Vincent Lebon de m'avoir accueilli dans son unité de recherche pour réaliser mon doctorat.

Je voudrais remercier mon directeur de thèse, le docteur Bertrand Kuhnast, qui m'a permis de réaliser ce travail au sein de son équipe. Il a toujours été très disponible et m'a apporté un grand soutien dans la réalisation de ce projet. Le temps passé (depuis plus de trois ans et demi) sous sa direction a été extrêmement enrichissant pour moi. Je voudrai également le remercier pour l'aide apportée lors de la rédaction de ce manuscrit.

Je tiens ensuite à remercier le docteur Fabien Caillé, qui m'a encadré durant ces trois ans de thèse. Ses conseils ainsi que sa patience ont su m'orienter dans la conduite de ces travaux malgré des périodes plus compliquées. Sa disponibilité et son engagement envers mon travail ont été essentiels. Il a su m'encourager tout au long de ce projet. Merci également pour les corrections et la relecture de ce manuscrit, qui n'ont pas été de tout repos. Ça y est l'oisillon prend enfin son envol.

Je voulais ensuite remercier tous les membres de l'équipe de chimie, tout d'abord Mylène, pour son aide et ses conseils au laboratoire, les sorties et les nombreuses séances à Arkose ! Je remercie Simon pour sa patience et son écoute de tous les jours, sa bonne humeur ainsi que les nombreuses parties de RL perdues.

Merci à Marie-Anne, pour les manips effectuées ensemble qui m'ont beaucoup appris. Bon courage pour tes futures aventures inattendues qui sont toujours très nombreuses ! Je voulais remercier Stéphane pour sa bonne humeur et sa disponibilité quand des problèmes d'automates

surviennent, mais également pour les séances d'escalades effectuées tout au long de ces trois ans. Je voulais remercier enfin Françoise, qui m'a beaucoup aidé en radiochimie comme au quotidien. Tu m'as apporté un soutien immense et je te remercie grandement pour cela.

Je voudrai remercier Lucas, j'ai beaucoup apprécié travailler avec toi, c'était très enrichissant pour moi d'encadrer un étudiant, je te remercie pour tout le travail effectué et je te souhaite le meilleur pour l'année à venir.

Merci à Salla pour les moments passés au labo et en congrès. Je continuerai à suivre tes périples sur Instagram et je te souhaite le meilleur pour la suite !

Je remercie également Steve et Alexandre pour votre compagnie (plus trop au labo du coup), pour les kebabs, sushi, pmu partagés ensemble. Alexandre je te souhaite bon courage pour la réalisation de ta thèse et Steve, garde ta bonne humeur à toute épreuve.

Je voudrai enfin finir par remercier Eugénie et Julien, mes deux collègues de bureau, qui sont devenus bien plus que ça à travers cette période. Merci à vous pour les moments partagés, l'aide au labo mais également au bureau, les sorties, les apéros, les pirates, les vacances, les rires mais aussi les galères (coucou Madrid). J'ai passé trois années merveilleuses et vous y êtes pour beaucoup alors merci. Eugénie, bon courage pour ta thèse et Julien, pour la suite de ton post doc.

Enfin, je voulais remercier les autres personnes que j'ai connues ici et que j'apprécie beaucoup, Gaëlle, Céline, Ambre, Goran, Sarah, Sophie, Amélie, Marie, et Soizic. Merci pour les moments au labo et les nombreuses sorties ! Merci également à toutes les personnes que j'ai pu croiser durant mon aventure à BioMaps.

Merci également aux biologistes pour leur implication dans mes « manip », Charles, Benoît, Caroline et finalement Soizic qui m'a fait découvrir les joies du WB, ce fut très enrichissant.

Je remercie également Huixiong Chen, Christiane Garbay et Louna Mossino pour la collaboration qui a été menée durant ce projet doctoral.

Je voulais remercier mes trois coloc, Joseph, Antoine et évidemment Mathis, avec qui j'ai partagé beaucoup de bons moments. Bon courage pour vos thèses et vos travaux.

Mes derniers mots à ma famille qui a su me soutenir durant cette période pas toujours facile, particulièrement à ma mère qui m'a toujours encouragé et aidé au quotidien depuis toutes ces années. Je voulais évidemment terminer par Johanna, qui m'a soutenu dans les moments difficiles et qui a été là depuis le début.

Je remercie enfin la Froma'Gilles pour la confiance accordée en tant que responsable logistique.

Abréviations et symboles

Ac	Acétyle
ACN	Acétonitrile
AcOEt	Acétate d'éthyle
AcOH	Acide acétique
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AiO	All In One
Alloc	Allyloxy-carbonyle
A _M	Activité molaire
AMM	Autorisation de mise sur le marché
Aq.	Aqueux / aqueuse
Ar	Aromatique
ARN	Acide Ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
Boc	<i>Tert</i> -butoxycarbonyle
BOP	Hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yloxytris(diméthylamino)phosphonium
CCM	Chromatographie sur couche mince
DBD	DNA Binding Domain (domaine de liaison à l'ADN)
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène
DCM	Dichlorométhane
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine
DMAP	<i>N,N</i> -diméthyl-4-aminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DMI	1,3-diméthyl-2-imidazolidinone
DMSO	Diméthylsulfoxyde
Et	Ethyle
Et ₂ O	Diéthyléther
Et ₃ N	Triéthylamine
eq	Equivalent
FAK	Focal Adhesion Kinase
FDG	2-fluoro-2-désoxy-D-glucose
GFP	Green fluorescent protein
HATU	hexafluorophosphate de (diméthylamino)- <i>N,N</i> -diméthyl(3 <i>H</i> -[1,2,3]triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridin-3-yloxy)méthaniminium
HOBt	Hydroxybenzotriazole
HPLC	High performance liquid chromatography (chromatographie liquide haute performance)
HRMS	High resolution mass spectrometry (spectrométrie de masse haute résolution)
IC ₅₀	Concentration inhibant 50 % de la liaison ligand-récepteur
IRM	Imagerie par résonance magnétique

J	Constante de couplage (Hz)
K ₂₂₂	4,7,13,16,21,24-hexaoxa-1,10-diazabicyclo[8.8.8]hexacosane
LC-MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
MDM2	Murine double minute 2
Me	Méthyle
MeOH	Méthanol
Ms	Mésyle (méthylsulfonyle)
Nu	Nucléophile
NMR	Nuclear magnetic resonance (résonance magnétique nucléaire)
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAN	<i>p</i> -anisaldéhyde
PCR	Polymerase chain reaction
Pd/C	Palladium sur charbon
PEG	Polyéthylène glycol
Ph	Phényle
Py	Pyridine
ppm	Partie par million
QMA	Quaternary méthyl ammonium
quant.	Quantitatif
RAS	Radioactivité spécifique
RRC	Rendement radiochimique
SK1	Sphingosine Kinase 1
S _N 2	Substitution nucléophile d'ordre 2
S _N Ar	Substitution nucléophile aromatique
t _{1/2}	Période radioactive d'un radioisotope
TBAF	Fluorure de tétrabutylammonium
TBS	<i>Tert</i> -butyldiméthylsilyle
TBDPS	<i>Tert</i> -tributyldiphénylsilyle
tBu	<i>Tert</i> -butyle
TDM	Tomodensitométrie
TEMP	Tomographie par émission monophotonique
TEP	Tomographie par émission de positons
THF	Tétrahydrofurane
TFA	Acide trifluoroacétique
UV	Ultraviolet
XantPhos	4,5-Bis(diphénylphosphino)-9,9-diméthylxanthène

AVANT-PROPOS

Ce doctorat a été réalisé du 12 octobre 2020 au 31 décembre 2023 au sein de l'équipe Développement de Radiopharmaceutiques et d'agents d'Imagerie (DRIM) du Laboratoire d'imagerie BIOMédicale MultimodAle Paris-Saclay (BioMaps, UMR CEA-INSERM-Paris-Saclay) au Service Hospitalier Frédéric Joliot (SHFJ) à Orsay. Le SHFJ est un des Départements de l'institut Joliot, lui-même rattaché à la Direction de la Recherche Fondamentale (DRF) du Commissariat à l'Énergie Atomique et aux énergies alternatives (CEA). Il s'agit d'un centre d'imagerie médicale installé sur le site hospitalier d'Orsay. Le SHFJ assure à la fois le rôle de service de médecine nucléaire de l'hôpital d'Orsay et de laboratoire de recherche et développement dans les domaines de l'imagerie en oncologie et en neurologie, des systèmes d'instrumentation et de la radiochimie.

Les méthodes d'imagerie médicale ont pour objectif d'obtenir des informations anatomiques ou fonctionnelles dans le but d'établir un diagnostic, effectuer un suivi thérapeutique ou bien étudier des processus biologiques. Il existe plusieurs modalités d'imagerie qui possèdent une complémentarité quant à l'information qu'elles permettent d'obtenir. Les travaux présentés ici portent en particulier sur la tomographie par émission de positons (TEP), une technique d'imagerie moléculaire fonctionnelle employée en médecine nucléaire. Elle permet l'observation et la quantification de radiotraceurs, des composés radioactifs marqués avec un atome émetteur de positons comme le carbone-11 ou le fluor-18. Cette modalité d'imagerie est très utilisée en oncologie, notamment grâce au [¹⁸F]FDG ([¹⁸F]Fluorodésoxyglucose), un analogue du glucose permettant la visualisation des tumeurs. Cependant, cette technique d'imagerie est limitée par le nombre restreint de traceurs disponibles, ne permettant pas de différencier les différents types de tumeurs selon leurs spécificités. C'est pourquoi la médecine du futur s'oriente vers le développement de radiotraceurs plus spécifiques, ciblant des biomarqueurs oncologiques caractéristiques, dans le but d'améliorer la compréhension des mécanismes physiopathologiques du cancer mais aussi pour soutenir le développement de nouvelles thérapies. Dans ce contexte, mes travaux de thèse ont consisté à développer de nouveaux radiotraceurs pour l'imagerie TEP *in vivo* de biomarqueurs dérégulés perturbant le cycle cellulaire en oncologie. Il s'agit des protéines p53, FAK et SK1 qui participent à la prolifération incontrôlée des cellules tumorales ou qui peuvent être des marqueurs d'agressivité ou de mauvais pronostic.

Ce manuscrit est composé de quatre chapitres. La première partie introduit le contexte scientifique des travaux réalisés et constitue un état de l'art des techniques radiochimiques disponibles et en lien avec le sujet de thèse. Elle traite notamment des différentes modalités d'imagerie médicale, avec une attention particulière donnée à la tomographie par émission de positons. Elle présente également la radiochimie du fluor-18 et du carbone-11 ainsi que les cibles pharmacologiques étudiées durant ces travaux de thèse. La deuxième partie présente les résultats de recherches obtenus concernant les cibles étudiées, les traceurs développés et leur marquage au carbone-11 ou au fluor-18 ainsi que leur évaluation biologique *in vitro*. La troisième partie, légèrement à la marge du reste des travaux de thèse, présente un projet annexe portant sur l'imagerie TEP de la démyélinisation dans un contexte de maladie neurodégénérative, qui avait été commencé lors d'un précédent stage et qui méritait d'être approfondie. Enfin, la quatrième partie décrit les protocoles expérimentaux de synthèse organique, de radiochimie ainsi que d'évaluations biologiques qui ont été menées tout au long de ces travaux. Cette dernière partie a volontairement été rédigée en anglais afin de faciliter sa diffusion. Des sections dédiées aux références, aux formations et productions scientifiques effectuées viennent compléter ce manuscrit.

A propos des productions scientifiques

Publications:

- ✓ Beuché, S., Peyronneau M.A., Jégo B., Denis C., Bourbon P., Chauvière C., Santerre C., Truillet C., Kuhnast B., Caillé F., Design, Radiosynthesis, and Evaluation of New Fluorinated Analogs of MeDAS for Myelin PET Imaging, *J. Med. Chem.* **2023**, *66*, (12), 8030–8042
- ✓ Beuché, S., Martin-Aubert S., Robin P., Denis C., Servent D., Truillet C., Kuhnast B., Caillé F., Carbon-11 and fluorine-18 derivatives of CP31398 to target p53 with PET, en cours de rédaction

Communications orales:

- ✓ Development of original radiotracers for PET imaging targeting p53 in oncology, Journée de l'école doctorale 2MIB, Orsay, France, 2023
- ✓ Synthesis of original radiotracers for PET imaging of cell cycle deregulations in oncology, NOMATEN, Helsinki, Finlande, 2022
- ✓ Synthesis and radiolabeling of original covalent inhibitors of focal adhesion kinase for PET imaging, FLI, Grenoble, France 2021
- ✓ Synthesis, radiolabeling and metabolism of new fluorine-18 derivatives of MeDAS for PET imaging of demyelination, eSRS, 2021

Posters:

- ✓ Development of original radiotracers for PET imaging targeting p53 in oncology, EMIM, Salzburg, Autriche, 2023
- ✓ Original fluorinated MeDAS derivatives for PET imaging of demyelination: synthesis, fluorine-18 radiolabeling and in vivo characterization, GDR-AIM Orléans. France, 2022
- ✓ Synthesis, radiolabeling and fluorescence imaging of new fluorine-18 derivatives of MeDAS for PET imaging of demyelination, ISRS, Nantes, France, 2022
- ✓ Synthesis and radiolabeling of original covalent inhibitors of Focal Adhesion Kinase for PET imaging, ISRS, Nantes, France, 2022
- ✓ Synthesis and radiolabeling of [11C]CP31398 and fluorine-18 derivatives for PET imaging targeting p53, ISRS, Nantes, France, 2022

A propos des formations effectuées

- ✓ Intégrité scientifique dans les métiers de la recherche (15h)
- ✓ Ensure a safe and sustainable food for the planet: a big challenge (12h)
- ✓ Formation complémentaire de radioprotection (14h)
- ✓ Ecole d'été: Objet interdisciplinaire Health and Therapeutic Innovation, Saint-Rémy-Lès-Chevreuses, France (20h)
- ✓ Journées de l'école doctorale 2MIB 2021 (3h)
- ✓ Journées de l'école doctorale 2MIB 2022 (6h)
- ✓ Journées de l'école doctorale 2MIB 2023 (6h)
- ✓ Ecole d'automne : EU Teaming project NOMATEN, Espoo, Finlande (25h)
- ✓ GDR Agents d'Imagerie Moléculaires (18h), Orléans, France
- ✓ Agents d'imagerie moléculaires WP1 FLI, Grenoble, France (18h)
- ✓ International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences; SRS, Nantes, France (18h)
- ✓ European Molecular Imaging Meeting, ESMI, Salzburg, Autriche (18h)
- ✓ Vacations : encadrement de travaux pratique de chimie organique, IUT d'Orsay, Orsay, France (157h)

Table des matières

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
I. Le cancer : l'un des plus grands défis santé du XXIème siècle	3
<i>Présentation générale</i>	3
<i>Complexité de la maladie : des cancers différents et hétérogènes</i>	4
<i>Traitements contre le cancer : espoirs et limites</i>	5
I.1. <i>Diagnostic clinique du cancer</i>	7
I.2. <i>Imagerie médicale en oncologie</i>	8
I.3. II. La tomographie par émission de positons et oncologie	10
I.4.	
I.5. <i>Généralités</i>	10
<i>Principe du fonctionnement de l'imagerie TEP</i>	11
II.1. <i>Radio-isotopes émetteurs de positons utilisés en TEP</i>	12
II.2.	
II.3. <i>Caractéristiques des différents radio-isotopes</i>	12
II.3.1. <i>Production des radio-isotopes</i>	14
II.3.2. <i>Production de radioisotopes en France</i>	16
II.3.3.	
II.4. <i>Imagerie TEP en oncologie</i>	17
II.4.1. <i>Radiopharmaceutiques utilisés actuellement en oncologie</i>	17
II.4.2. <i>Limitations et enjeux pour la médecine du futur</i>	20
II.5. <i>Radiochimie des isotopes pour l'imagerie TEP</i>	21
II.5.1.	
II.5.2. <i>Radio-isotopes coordinants</i>	21
<i>Radioisotopes covalents</i>	22
III.1. III. Objectifs des travaux de thèse	41
III.2. <i>Cibles originales pour le développement de nouveaux outils pour l'imagerie TEP</i>	
III.3. <i>en oncologie</i>	41
<i>Choix pertinent d'un traceur pour l'imagerie TEP</i>	43
<i>Molécules ciblées</i>	44
CHAPITRE 1 : DÉVELOPPEMENT DE RADIOTRACEURS POUR L'IMAGERIE	
I.1. TEP DE LA PROTÉINE p53	49
I.2.	
I.3. La protéine p53, un suppresseur de tumeur	51
I.4.	
<i>Structure et fonction de p53</i>	51
<i>Mécanismes d'action de p53</i>	52
<i>Mutations de p53 et cancer</i>	52
<i>Diagnostics et traitements visant p53</i>	53

	<i>Imagerie de p53</i>	54
II.	Imagerie TEP de p53 : une nouvelle technique pour le suivi thérapeutique et le développement de médicaments.....	55
	<i>Avantages de l'imagerie TEP de p53</i>	55
I.5.	<i>CP31398 : un candidat radiotraceur de p53</i>	55
	<i>Objectifs des travaux</i>	57
III.	Synthèse des composés CP31398, F-CP31398 et PEG-CP31398 et de leurs précurseurs	
II.1.	de marquage	58
II.2.		
II.3.	<i>Synthèse du composé CP31398 et de son précurseur de marquage</i>	58
	Formation de l'intermédiaire styrylquinazolin-4(3H)-one.....	58
III.1.	Formation de l'intermédiaire quinazolin-4-yl	60
III.1.1.	Synthèse du précurseur de marquage par déméthylation de CP31398	61
III.1.2.	Synthèse des analogues fluorés du composé CP31398.....	63
III.1.3.	Radiomarquage au carbone-11 des structures moléculaires ciblant p53.....	66
IV.	Radiomarquage au carbone-11 du composé CP31398.....	66
III.1.4.	Radiomarquages au fluor-18 des composés PEG-CP31398 et F-CP31398.....	69
IV.1.	Radiomarquage du composé PEG-CP31398	69
V.	Radiomarquage du composé F-CP31398.....	73
V.1.	Radiomarquage du composé PEG-CP31398	69
V.2.	Radiomarquage du composé F-CP31398.....	73
VI.	Evaluation biologique des traceurs ciblant p53.....	75
VI.1.		
VI.2.	<i>Etude de la liaison entre le composé [¹⁸F]PEG-CP31398 et p53</i>	75
	<i>Autoradiographies sur coupes de tumeurs</i>	79
VII.	Conclusions et perspectives	81
 CHAPITRE II : DÉVELOPPEMENT DE RADIOTRACEURS POUR L'IMAGERIE		
TEP DE LA PROTÉINE FOCAL ADHESION KINASE		
I.1.		83
I.2.		
I.	La Focal Adhesion Kinase : une protéine oncogène	85
I.3.		
I.4.	<i>Structure de la protéine</i>	85
I.5.	<i>Voies de signalisation cellulaires et fonctions biologiques</i>	85
II.1.	<i>Implication de FAK dans le cancer</i>	86
II.2.	<i>Thérapies ciblées contre FAK</i>	88
	<i>Imagerie de FAK</i>	90
II.	Développement de radiotraceurs pour l'imagerie TEP de FAK	91
	<i>Inhibiteurs sélectifs de FAK</i>	91
	<i>Objectifs des travaux</i>	92

III.	Développement du radiotracer $[^{11}\text{C}]7\text{f}$, analogue isotopique de l'inhibiteur covalent 7f marqué au carbone-11	93
	<i>Synthèse du composé 7f et son précurseur de marquage</i>	93
	Synthon pyridine	94
	Synthon aniline.....	95
	Synthon squarate	95
III.1.	<i>Radiomarquage isotopique au carbone-11 du composé modèle 24</i>	99
III.1.1.	Développement d'analogues fluorés du composé 7f et de leurs précurseurs de	
III.1.2.	marquage	102
III.2.	<i>Synthèse du composé Py-FAK</i>	102
	<i>Synthèse du composé FE-FAK</i>	103
IV.1.	<i>Synthèse d'un nouvel analogue : le composé PEG-FAK</i>	105
IV.2.	Conclusions et perspectives	117
IV.3.		
CHAPITRE III : DÉVELOPPEMENT DE RADIOTRACEURS POUR L'IMAGERIE		
TEP DE LA PROTÉINE SPHINGOSINE KINASE 1		
119		
I.	La sphingosine kinase 1 : un biomarqueur oncologique	121
I.1.	<i>Présentation de la sphingosine kinase 1</i>	121
I.2.	<i>Voies de signalisation cellulaire et fonctions biologiques</i>	121
I.3.	<i>Implication de SK1 dans la cancérogénèse</i>	122
I.4.	<i>Thérapies ciblant SK1 et SIP1R</i>	123
I.5.	<i>Imagerie de SK1</i>	125
II.1.	Développement de radiotraceurs ciblant la protéine SK1	126
II.2.	<i>Le composé PF-543 : un motif prometteur</i>	126
III.1.	<i>Objectifs des travaux</i>	127
III.1.1.	Développement du radiotracer $[^{18}\text{F}]FH\text{-SK1}$	128
III.1.2.	<i>Synthèse de la référence FH-SK1 et de son précurseur de marquage</i>	128
III.2.	Stratégie passant par une étape d'hydrogénation tardive	128
IV.1.	Stratégie passant par une réduction précoce	130
	<i>Radiomarquage au fluor-18 du précurseur 63</i>	134
IV.	Evaluation biologique du composé FH-SK1	138
	<i>Evaluation de l'affinité du traceur $[^{18}\text{F}]FH\text{-SK1}$ pour la protéine SK1</i>	138
V.	Conclusions et perspectives	139

CHAPITRE IV : DÉVELOPPEMENT DE RADIOTRACEURS POUR L'IMAGERIE

TEP DE LA DÉMYÉLINISATION	141
I. Imagerie TEP des maladies neurologiques	143
<i>Justification de ce travail à la marge des travaux de thèse</i>	143
<i>Design, Radiosynthesis and Evaluation of New Fluorinated Analogs of MeDAS for Myelin PET Imaging</i>	145
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	159
I.1 PARTIE EXPÉRIMENTALE	165
I.2. Organic synthesis	167
I.1. General Procedures	167
I.2. Experimental procedures	168
II. Radiochemistry	216
General information	216
Automated synthesizers	216
II.1. TRACERlab™ FX FN	216
II.2.1. TRACERlab™ FX N Pro	217
II.2.2. Trasis AllInOne (AIO)	218
II.2.3. TRACERLab™ FX C Pro	219
II.2.4. Synthra MeI _{plus} Research	220
II.2.5. Iphase C-11 Pro2	222
II.3. Analytical methods	223
II.3.1. Quality Control	223
II.4. Thin Layer Chromatography	223
II.4.1. Fluorine-18 radiochemistry	223
II.4.2. Fluorine-18 production	223
II.5. Experimental procedures for the automated production of fluorine-18 radiotracers	224
II.5.1. Carbon-11 radiochemistry	226
Radioisotope production	226
III.1. Experimental procedures for the automated production of [¹¹ C]CH ₃ I and	
III.2. [¹¹ C]CH ₃ OTf	226
III.3. Biochemistry	227
Cell culture	227
Transfection	228
Binding tests	228
Gel shift	228

<i>Gel Electrophoresis</i>	229
<i>Western Blot of gel</i>	229
<i>Autoradiography of gel</i>	229
<i>Immunohistochemistry</i>	230
<i>Autoradiography of tumor sections</i>	230

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	231
--	-----

III.5.

III.6.

III.7.

III.8.

III.9.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

I. Le cancer : l'un des plus grands défis santé du XXIème siècle

Présentation générale

Le cancer est un terme générique regroupant toutes les maladies provoquées par la transformation de cellules qui deviennent anormales et prolifèrent de façon excessive et incontrôlée. Ces cellules dérégées finissent par former une masse que l'on nomme tumeur maligne. Ces cellules ont tendance à envahir les tissus voisins et à se détacher de la tumeur. Elles vont alors migrer par les vaisseaux sanguins et les vaisseaux lymphatiques pour aller former d'autres tumeurs que l'on nomme métastases. En se développant de façon anarchique, les cellules cancéreuses envahissent et détruisent les tissus qui les entourent et peuvent devenir un réel danger pour la survie du patient. L'OMS a défini le stade tumoral (ou niveau d'extension tumoral) qui établit un score en fonction du développement du cancer. Il prend en compte la taille de la tumeur, l'existence éventuelle de métastases et leur distance par rapport à la tumeur primitive. Ces données, déterminées grâce à des techniques d'imagerie ou par chirurgie, permettent de planifier et d'anticiper l'effet des traitements ainsi que de prévoir l'évolution de la maladie. Le cancer est la première cause de mortalité prématurée en France devant les maladies cardiovasculaires et représente un frein majeur à l'augmentation de l'espérance de vie.¹ D'après les statistiques de l'OMS, plus de 19 millions de cas de cancers ont été détectés dans le monde et plus de 9 millions de personnes sont décédées à cause d'une maladie en lien avec le cancer en 2020.² Le nombre de cancers a significativement augmenté durant les dernières années (Figure 1).³ Cette tendance va se maintenir et le nombre estimé de cancers dans le monde atteindra 30,2 millions en 2040.⁴

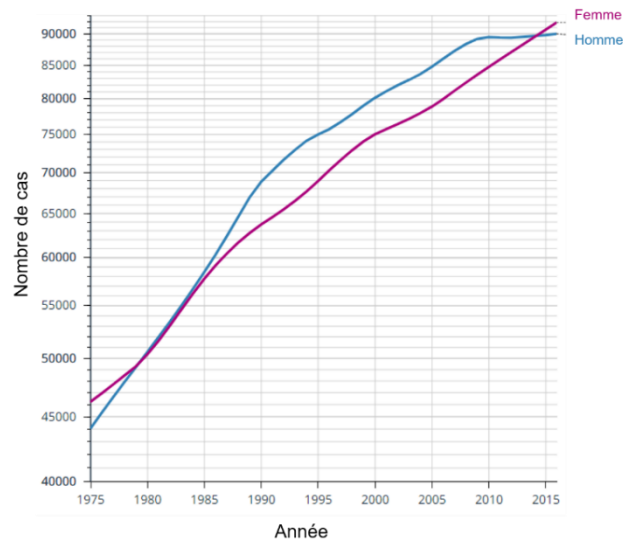


Figure 1: Cas de cancers (hors mélanome) relevés chez l’homme et la femme entre 1975 et 2015 aux Etats-Unis⁵

Complexité de la maladie : des cancers différents et hétérogènes

I.2.

Le cancer est une maladie complexe qui peut résulter de nombreux facteurs et mécanismes. Les causes du cancer peuvent être divisées en deux grandes catégories : les facteurs génétiques et les facteurs environnementaux. Les facteurs génétiques comprennent le patrimoine génétique intrinsèque à l’individu, favorisant le développement de tumeur, c’est souvent un caractère héréditaire. Les facteurs environnementaux quant à eux, peuvent être dus à l’exposition à des agents altérants l’ADN ou bien liés au vieillissement des gènes au cours de la vie. Les facteurs environnementaux comprennent des éléments tels que l’exposition à des substances toxiques, comme le tabac ou les radiations ionisantes par exemple.

En d’autres termes, tous ces facteurs vont induire des mutations ou des dommages cellulaires entraînant le développement et la prolifération anormale des cellules. Les mutations génétiques jouent un rôle clé dans la formation du cancer. Ces altérations peuvent conduire à la croissance incontrôlée des cellules, à leur résistance à la mort cellulaire programmée (apoptose) et à développer leur capacité à envahir les tissus environnants. Il est également important de noter une caractéristique des cellules tumorales liée à ces dérégulations : leur hétérogénéité. Elle fait référence à la diversité des cellules composant la tumeur. Elles peuvent varier aussi bien sur le plan génétique, de leurs altérations moléculaires, de leur capacité à proliférer ou bien à résister aux traitements. L’hétérogénéité est observée aussi bien entre différents types de cancer qu’au

sein d'une même tumeur chez un patient donné.

Ainsi, comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces dérégulations cellulaires est essentiel pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées qui visent à rétablir le fonctionnement normal des cellules cancéreuses et à inhiber leur prolifération anarchique. La recherche continue dans ce domaine et ouvre de nouvelles perspectives pour la compréhension et le traitement du cancer, avec l'espoir de fournir des options de traitement plus efficaces et personnalisées aux patients atteints de cette maladie dévastatrice.

Traitements contre le cancer : espoirs et limites

Il existe différentes stratégies de traitements anticancéreux qui peuvent avoir pour objectifs de ralentir ou d'arrêter la progression tumorale. Le choix de ces stratégies, qui peuvent être combinées, dépend du type de cancer et de sa progression, des organes touchés ainsi que du stade tumoral au moment de la prise en charge.

La chirurgie a pour but de retirer tout ou une partie de la tumeur du patient et représente 6% des prises en charge de cancer.⁶ C'est un traitement efficace pour les tumeurs solides non-métastatiques souvent rencontrées dans le cancer du côlon ou du sein par exemple. La chirurgie est souvent combinée avec d'autres lignes de traitement, une approche souvent indispensable pour éradiquer la totalité des tumeurs ou contrôler la progression de la maladie.

Parmi les autres lignes de traitements disponibles contre le cancer, la radiothérapie utilise des radiations ionisantes dans le but de réduire la taille des tumeurs en endommageant l'ADN des cellules cancéreuses. Il existe deux types de radiothérapie : externe et interne. La radiothérapie externe est la plus répandue et consiste en l'utilisation d'un faisceau de rayons gamma ou X focalisé sur la zone tumorale du patient tout en protégeant au maximum les tissus sains environnants.⁷ La radiothérapie interne consiste quant à elle en l'administration d'une substance radioactive qui a pour but de se fixer à la tumeur. Les rayonnements de haute énergie (alpha, électrons) émis par la substance (actinium-225 ou astate-211 par exemple) vont alors détruire les cellules tumorales en épargnant les tissus sains à proximité. Depuis quelques années, on observe l'émergence de la radiothérapie interne vectorisée qui consiste en l'utilisation d'un médicament ou d'un anticorps marqué avec un atome radioactif et qui se fixe spécifiquement à un marqueur tumoral, permettant ainsi la destruction sélective des cellules cancéreuses.⁸ Ce

traitement s'avère efficace dans le cas de tumeurs solides et localisées. La radiothérapie externe est généralement utilisée après traitement par chirurgie afin d'éviter une reprise de croissance de la tumeur et est souvent combinée avec une approche par chimiothérapie pour une efficacité accrue.

L'une des lignes de traitement les plus couramment utilisées (36% des traitements administrés en 2020) reste aujourd'hui la chimiothérapie qui consiste en l'administration d'un ou plusieurs composés chimiques toxiques pour éradiquer les tumeurs.⁹⁻¹¹ Les mécanismes d'action de la chimiothérapie sont variés et ont pour finalité la mort des cellules cancéreuses ou l'arrêt de leur multiplication en interagissant avec la synthèse d'ADN, d'ARN ou encore de protéines intervenant dans le bon fonctionnement de ces cellules. Malgré son succès, la chimiothérapie conventionnelle est une approche systémique manquant souvent de spécificité pour les cellules cancéreuses, avec une forte toxicité pour les cellules saines dans le reste de l'organisme. Le développement de thérapies ciblées a donc émergé car ces techniques présentent une grande spécificité pour les cellules tumorales et moins de toxicité envers les cellules saines. L'immunothérapie peut être considérée comme une sous-catégorie de thérapie ciblée permettant de stimuler le système immunitaire du corps humain pour aboutir à l'élimination des cellules cancéreuses. On peut notamment penser aux inhibiteurs de point de contrôle immunitaire (traitements cibant PD-1 et/ou PD-L1) par exemple. Par ailleurs, un exemple de thérapie ciblée est l'utilisation du trastuzumab (Herceptin), un anticorps monoclonal humanisé utilisé chez la femme dans le traitement du cancer du sein précoce ou métastatique.¹² Grâce à sa fixation spécifique sur la protéine HER2 des cellules cancéreuses, le trastuzumab active le système immunitaire tout en inhibant la croissance cellulaire tumorale. Ce puissant outil thérapeutique est très efficace dans le mélanome (60% de réponse) mais présente néanmoins quelques limites. En effet, si cette technique offre d'excellents résultats chez certains patients, elle peut s'avérer totalement inefficace chez d'autres voire toxique. De plus, certains organes comme le cerveau contiennent que peu de cellules immunitaires, rendant difficile l'utilisation de ce traitement. On peut également noter l'accès difficile à cet organe, en effet les anticorps ne pénètrent pas dans la BHE si celle-ci est intacte.

Par ailleurs, de nouveaux traitements émergent en combinaison avec ceux existants actuellement. On pourrait citer les traitements métaboliques tels que le régime cétogène. C'est une approche alimentaire qui se caractérise par une consommation élevée de graisses et une forte restriction en glucide. Le régime aurait pour effet de réduire la croissance tumorale en privant les cellules cancéreuses de glucose. En limitant les glucides, le corps entrerait dans un

état de cétose, où les graisses sont utilisées pour produire des cétones, carburant alternatif pour les cellules. Cette transition métabolique pourrait potentiellement affaiblir les cellules cancéreuses et améliorer l'efficacité des traitements conventionnels cités ci-avant. Il est important de noter que les recherches sont encore en cours dans ce domaine et que ce traitement ne doit pas être considéré comme un substitut mais plutôt comme un complément potentiel dans le cas du suivi d'un traitement de type chimiothérapie par exemple.

Ainsi, de nombreux traitements sont actuellement disponibles, tous possédant des avantages et des inconvénients. Un des enjeux majeurs de la lutte contre le cancer et de la médecine personnalisée se situe donc au niveau du choix du traitement le plus adapté à chaque patient. Le développement de techniques diagnostiques corps entier permettant une détection tumorale plus précoce et tenant compte de l'hétérogénéité tumorale et des caractéristiques biochimiques des tumeurs est alors primordial.

I.4. Diagnostic clinique du cancer

Lors de la suspicion de cancer, le premier diagnostic est souvent clinique (état général, palpation) et complété par des examens biologiques et d'imagerie. Un bilan sanguin et urinaire peut permettre de relever la présence possible de marqueurs tumoraux, comme le taux de Prostate Specific Antigen (PSA) dont la surexpression peut indiquer la présence d'une tumeur au niveau de la prostate. Enfin, l'unique moyen de confirmer la présence d'une tumeur et d'en préciser sa nature reste la biopsie. Un échantillon de tumeur est prélevé chez le patient et analysé par microscopie afin de déterminer la nature de la lésion cancéreuse et son degré d'agressivité. Bien qu'incontournable, la biopsie est un examen très invasif parfois difficile à réaliser sur certains organes, comme le cerveau par exemple. Il ne donne qu'un aperçu local de la tumeur et ne permet donc pas de détecter la présence éventuelle de métastases. Enfin, la biopsie ne prélève qu'une petite partie de la tumeur et ne rend donc pas compte de son hétérogénéité. C'est pourquoi l'imagerie médicale tient également une place prépondérante dans le diagnostic oncologique.

Imagerie médicale en oncologie

Le terme « imagerie médicale » regroupe un ensemble de techniques qui permettent d'obtenir des images en temps réel des parties internes du corps à un niveau moléculaire ou anatomique. Elles permettent d'accéder à des informations sur la localisation, la taille ou encore l'activité métabolique des tumeurs. Elles permettent aussi de déterminer la présence de biomarqueurs spécifiques caractérisant par exemple l'agressivité, la prolifération ou encore la vascularisation tumorale. Elles sont utilisées pour le diagnostic, pour établir une stratégie thérapeutique mais aussi pour le suivi du patient tout au long de son traitement. Plusieurs modalités d'imagerie sont régulièrement utilisées en oncologie :

- La tomodensitométrie (TDM) : elle permet l'obtention d'images anatomiques ou fonctionnelles détaillées du patient grâce aux rayons X. Cette technique présente des avantages comme la rapidité d'acquisition ainsi que la possibilité d'observer différents organes et régions d'intérêt en même temps. Ses limitations en revanche sont l'exposition du patient aux rayons X ainsi que l'utilisation d'agents de contraste pouvant présenter une certaine toxicité. Enfin, cette technique d'imagerie ne permet pas toujours d'accéder à des informations fonctionnelles et métaboliques.
- L'imagerie par résonance magnétique (IRM) qui permet d'obtenir des images (parfois fonctionnelles) de haute résolution. Elle permet notamment d'obtenir des images anatomiques des tissus mous comme les organes, les muscles ou encore le cerveau. Dans environ 30% des cas, l'IRM nécessite l'utilisation d'un agent de contraste, le plus souvent un complexe de gadolinium. Modérément coûteuse, l'IRM est l'une des techniques d'imagerie les plus répandues.
- L'échographie, technique se basant sur l'utilisation d'ondes sonores à haute fréquence (ultrasons) pour produire des images en temps réel d'organes, tissus et structures internes du corps. Cette technique est non invasive et n'utilise pas de rayonnements ionisants. Elle permet d'évaluer les structures en mouvement, comme le flux sanguin par exemple. Cependant, elle ne permet pas une visualisation de l'entièreté du corps en simultané, et offre une résolution moindre suivant l'accessibilité du tissu à observer.
- L'imagerie de fluorescence permet l'obtention d'images grâce à des sondes fluorescentes excitées au moyen d'une source lumineuse comme un laser par exemple. Une application majeure reste l'assistance opératoire à la chirurgie où la sonde fluorescente va guider le praticien pour lui permettre de visualiser avec précision les

zones à opérer. L'imagerie par fluorescence est cependant limitée en profondeur à cause de l'absorption de la lumière par les tissus biologiques.

- La scintigraphie ou tomographie par émission monophotonique (TEMP) implique l'injection d'une substance radioactive appelée radiotracer émetteur de rayonnement γ . Elle permet l'étude fonctionnelle de différents organes par la visualisation de la distribution du radiotracer dans le corps. Elle possède une bonne sensibilité et permet d'obtenir une image tridimensionnelle de différents organes. Elle offre ainsi une grande polyvalence diagnostique. Cependant, elle possède une résolution spatiale limitée et un coût relativement élevé par rapport à d'autres modalités d'imagerie.
- La tomographie par émission de positons (TEP) est une technique d'imagerie moléculaire qui permet de visualiser quantitativement des processus métaboliques ou des biomarqueurs spécifiques *via* l'utilisation de radiotraceurs émetteurs de rayonnements β^+ . Elle possède une sensibilité élevée permettant l'acquisition d'images fonctionnelles et métaboliques en temps réel avec une très haute résolution. Elle permet également l'acquisition d'image « corps entier » de façon peu invasive. Cependant, c'est une technique plutôt onéreuse limitée par la faible diversité de radiotraceurs disponibles. L'imagerie TEP est utilisée en combinaison avec d'autres modalités d'imagerie comme la TDM ou l'IRM dans le but de « recalcr » les images TEP sur une structure anatomique.

Ainsi, les différentes techniques d'imagerie présentées dans ce paragraphe sont très souvent complémentaires les unes aux autres. Chaque technique permet d'accéder à des informations uniques sur les structures anatomiques ou sur la fonctionnalité et la physiologie d'un organe. L'utilisation de combinaisons de ces techniques d'imagerie permet d'établir un diagnostic très précis, d'évaluer l'étendue des tumeurs ou encore réaliser des suivis de traitement pour pouvoir prendre les décisions thérapeutiques adaptées. Cette complémentarité joue donc un rôle essentiel dans l'amélioration des soins de santé et la prise en charge des patients. Dans le cas de l'oncologie, la TEP reste la technique d'imagerie de référence pour le diagnostic clinique des tumeurs et de leurs métastases

II. La tomographie par émission de positons et oncologie

Généralités

L'imagerie TEP est une technique d'imagerie moléculaire corps entier utilisée dans le domaine de la médecine nucléaire. Elle nécessite l'injection d'une molécule marquée radioactivement avec un atome émetteur de positons, que l'on appelle radiotracer. L'imagerie TEP est une technique extrêmement sensible capable de détecter des biomarqueurs à l'échelle subnanomolaire.¹³ Réputée de faible résolution spatiale comparée à d'autres techniques comme l'IRM ou la TDM, la TEP a connu des évolutions technologiques importantes lui permettant d'atteindre aujourd'hui des résolutions spatiales de l'ordre de quelques millimètres (en comparaison l'IRM permet des résolutions spatiales de l'ordre du millimètre en clinique). Capable de fournir des informations quantitatives grâce à l'étude pharmacocinétique de la distribution du radiotracer utilisé, l'imagerie TEP permet la compréhension de processus biologiques et la détermination de la concentration de biomarqueurs pathologiques.¹³

La qualité des images obtenues dépend à la fois des performances de l'imageur, du radiotracer utilisé ainsi que de la puissance des outils informatiques permettant la reconstruction de l'image (Figure 2).¹⁴ Différents traceurs ont été développés et commercialisés pour une utilisation en clinique. Le plus utilisé en oncologie reste le [¹⁸F]FDG.^{15,16} Dans le cadre de maladies neurologiques, c'est la [¹⁸F]FDOPA qui est utilisée, notamment pour le diagnostic de la maladie de Parkinson. Enfin, un autre exemple marquant est le [⁶⁸Ga]PSMA-11, utilisé pour le diagnostic du cancer de la prostate.

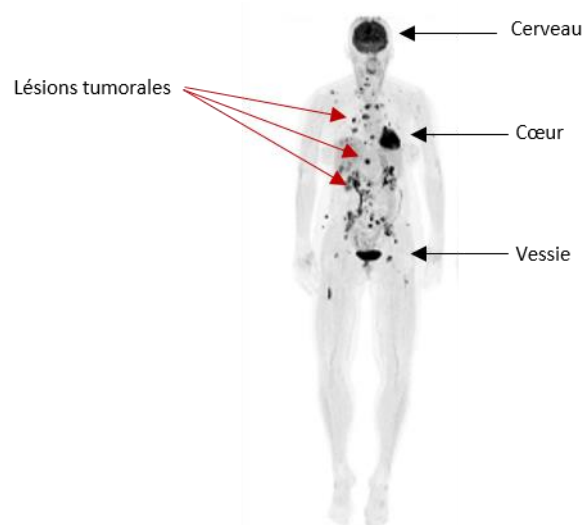


Figure 2: Image TEP-TDM corps entier au [¹⁸F]FDG d'un patient atteint de mélanome¹⁷

Principe du fonctionnement de l'imagerie TEP

Le fonctionnement de l'imagerie TEP est basé sur un comportement particulier des positons émis par l'atome radioactif présent sur le traceur. Le positon (β^+) est une particule de masse et de spin identiques à l'électron mais de charge opposée. Une fois émis par le radio-isotope, ce positon parcourt dans la matière un chemin dépendant de son énergie cinétique initiale appelé parcours moyen, une propriété intrinsèque à chaque isotope. Une fois que son énergie cinétique est nulle, le positon va se combiner avec un électron libre du milieu et engendrer le phénomène d'annihilation. Ce phénomène donne lieu à la production de deux photons (γ) d'énergie toujours égale à 511 keV chacun et émis en coïncidence à 180° l'un de l'autre (Figure 3).^{18,19}

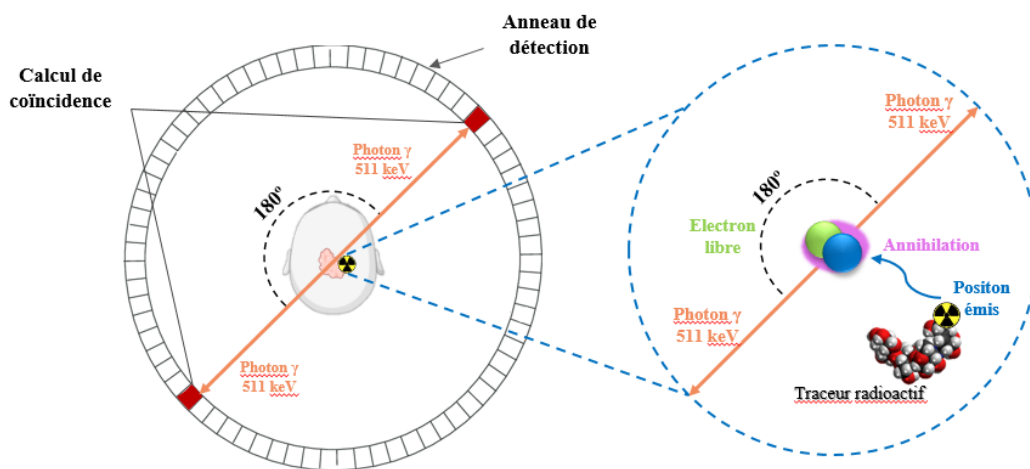


Figure 3: Phénomène d'annihilation et principe de fonctionnement de l'imagerie TEP

Ces deux photons émis en coïncidence sont alors détectés simultanément par une couronne de détecteurs disposée autour du patient lors de l'examen TEP. C'est ce phénomène de coïncidence qui confère à l'imagerie TEP sa très grande sensibilité comparée aux autres techniques d'imagerie médicale. Seuls les photons d'énergie 511 keV émis en coïncidence et détectés simultanément par deux détecteurs diamétralement opposés de la caméra seront pris en compte dans le signal final, limitant très fortement le bruit pouvant provenir d'autres sources de photons parasites. Des algorithmes de reconstruction permettent de reconstruire les images TEP à partir du signal enregistré en localisant la sphère, de rayon variable, dans laquelle la désintégration s'est produite. C'est de cette approximation que provient la faible résolution de l'imagerie TEP et qui est due au libre parcours moyen du positon qui représente la distance entre le point d'intérêt où se trouve réellement le radiotracer et le point d'annihilation qui est détecté. En conséquences, plus l'énergie du positon, dépendant des caractéristiques intrinsèques de chaque

radio-isotope, est élevée, plus ce parcours moyen sera long et plus la résolution spatiale sera faible.

Radio-isotopes émetteurs de positons utilisés en TEP

Caractéristiques des différents radio-isotopes

De nombreux éléments de la classification périodique possèdent des isotopes émetteurs de positons qui pourraient théoriquement être utilisés pour l'imagerie TEP. Le diagramme de Segré représenté en figure 4 montre la « vallée de la stabilité » des éléments stables existants (en noir), avec les isotopes radioactifs (les émetteurs de positons sont représentés en orange) de part et d'autre de la ligne noire, montrant bien la diversité d'isotopes disponibles. Néanmoins, seuls quelques uns sont utilisés, les critères de choix se faisant sur les caractéristiques intrinsèques de l'isotope (énergie du positon, demi-vie radioactive, mode de désintégration) mais aussi sur la facilité et le coût de production ou encore les méthodes de radiomarquage associées.

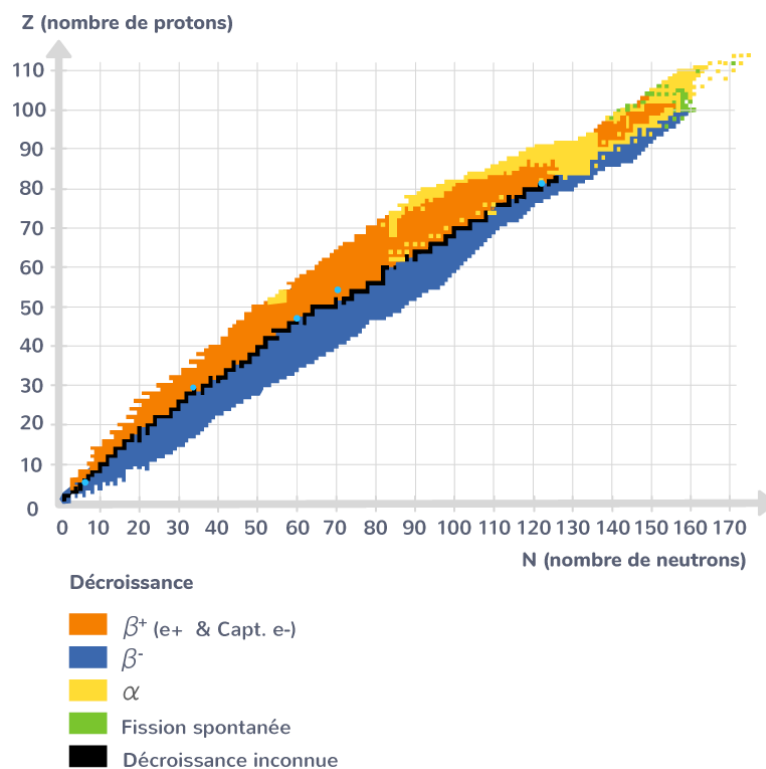


Figure 4: Diagramme de Segré présentant les isotopes de chaque atome de la classification périodique

Les radio-isotopes les plus utilisés aujourd'hui pour l'imagerie TEP sont le fluor-18 (^{18}F), le

carbone-11 (^{11}C), le zirconium-89 (^{89}Zr), le cuivre-64 (^{64}Cu) ainsi que le gallium-68 (^{68}Ga). Leurs caractéristiques physiques sont répertoriées dans le tableau 1.

Isotope	Demi-vie	$E_{\max}\beta^+$ (keV)	Parcours moyen maximum dans l'eau (mm)	Mode de décroissance	A_M^a (GBq/ μmol)	Chimie de marquage
^{11}C	20,4 min	960	4,1	β^+ (99,8%), CE	$3,41.10^5$	Covalente
^{18}F	109,8 min	635	2,4	β^+ (96,9%), CE	$6,33.10^4$	Covalente-Coordination
^{64}Cu	12,6 h	656	2,5	β^+ (17,5%), β^- , CE	$9,13.10^3$	Coordination
^{68}Ga	67,8 min	1899	8,2	β^+ (88,0%), CE	$1,02.10^5$	Coordination
^{89}Zr	78,4 h	902	3,8	β^+ (22,7%), CE, γ	$4,44.10^5$	Coordination

*CE : capture électronique (pas de radiation émise) ^aActivité molaire maximale théorique

Tableau 1: Caractéristiques physiques des radio-isotopes principalement utilisés en TEP

Les différents isotopes se caractérisent par :

- Une période radioactive, aussi appelée demi-vie ($t_{1/2}$), définie comme l'intervalle de temps au bout duquel le nombre de noyaux instables est réduit de moitié. Cette valeur est calculée grâce à la constante de désintégration λ caractéristique de chaque radioisotope.

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{\lambda}$$

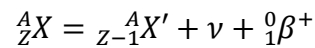
La demi-vie est une notion fondamentale qui va déterminer l'utilisation d'un radio-isotope. A titre d'exemple, la demi-vie très courte du carbone-11 ne permet pas la distribution de cet isotope depuis un site de production vers un hôpital et limite donc l'utilisation de celui-ci à des centres de recherche. La biodistribution de macromolécules comme les protéines ou les anticorps étant de plusieurs jours, l'utilisation d'isotopes à demi-vie plus longues comme le cuivre-64 ou le zirconium-89 est plus adaptée pour les radiomarquer.

- Une énergie maximale (E_{\max}), qui correspond à l'énergie maximale que peut posséder le positon libéré pour se déplacer dans le milieu jusqu'au phénomène d'annihilation avec un électron. C'est cette énergie qui influence la résolution spatiale de l'imagerie TEP. Plus E_{\max}

est élevée, plus la résolution sera faible.

- Un parcours moyen, correspondant à la distance moyenne que va parcourir le positon avant la perte totale de son énergie cinétique. Il dépend de l'énergie maximale E_{\max} du positon.

- Un mode de désintégration, décrivant le devenir du radioisotope. Un radionucléide émetteur de positons se désintègre par émission d'un positon (β^+) et d'un neutrino(ν) selon l'équation suivante :



La plupart des radio-isotopes possèdent plusieurs modes de désintégration concomitants. Plus la proportion de désintégration β^+ par rapport aux autres modes est importante, meilleure sera la statistique de comptage radioactif de la caméra TEP.

- L'activité molaire (A_M) théorique qui correspond à la quantité de radioactivité par unité de quantité de matière (exprimée en moles).

$$A_M(Bq/mol) = \frac{\ln(2) \times N_A}{t_{1/2}}$$

où N_A représente la constante d'Avogadro.

Lors de la synthèse d'un radiotraceur, l'activité molaire théorique n'est jamais atteinte, menant au phénomène de dilution isotopique dû à la présence de l'isotope stable dans le milieu réactionnel (dioxyde de carbone de l'air pour le carbone-11 ou fluor-19 présent dans les réactifs chimiques utilisés par exemple).

- Une chimie de marquage qui peut être soit covalente (carbone-11, fluor-18) soit de coordination (gallium-68, zirconium-89, cuivre-64). Cette chimie de marquage va déterminer le type de radiotraceur et les approches synthétiques de radiomarquage utilisées.

Production des radio-isotopes

Les radioisotopes utilisés pour l'imagerie TEP sont produits artificiellement par des cyclotrons biomédicaux, excepté le gallium-68 qui est produit par un générateur ${}^{68}\text{Ge}/{}^{68}\text{Ga}$. Le germanium-68 radioactif fixé sur une matrice se désintègre par capture électronique afin d'aboutir au

gallium-68 qui est élué sélectivement. A noter que le gallium-68 peut également être produit en cyclotron à partir de zinc-68.

Le cyclotron est un accélérateur électromagnétique de haute fréquence. L'action combinée d'un champ magnétique et d'un champ électrique permet d'accélérer un faisceau de particules chargées (des hydrures ou des deutons) entre deux électrodes métalliques où règne un vide poussé (10^{-5} mbar). Les particules provenant d'une source d'hydrogène située au centre du cyclotron vont alors être accélérées avec une trajectoire en spirale du centre vers l'extérieur de l'aimant tout en accumulant de l'énergie (de quelques MeV jusqu'à 70 MeV). Une fois l'énergie acquise, le faisceau d'hydrures est transformé en protons par passage sur une feuille de carbone appelée stripper puis dirigé vers une cible composée d'éléments stables (solides, liquides ou gazeux) pour permettre la réaction nucléaire aboutissant au radio-isotope souhaité en fonction du type de cible utilisé (Figure 5).

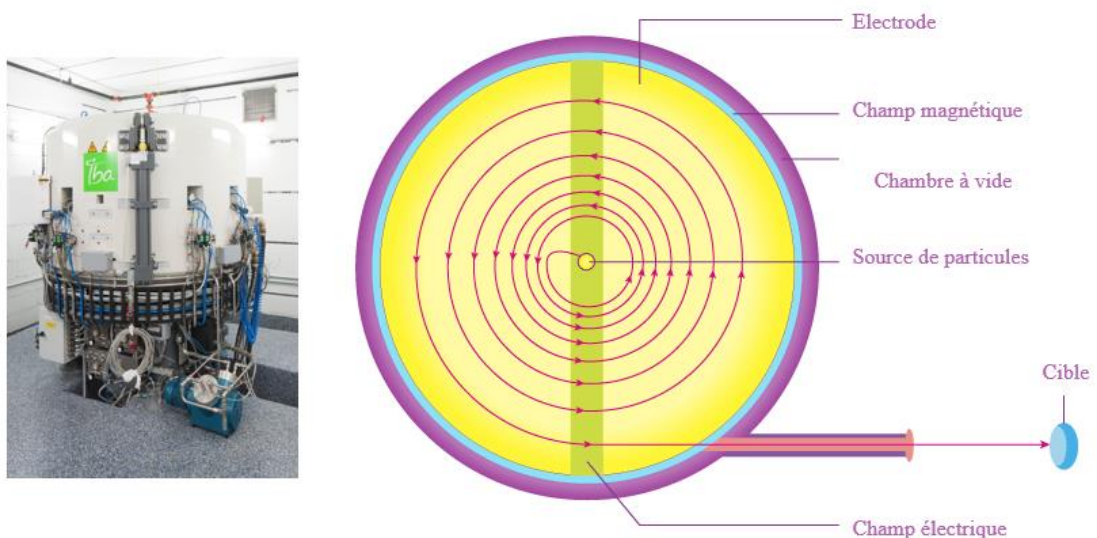
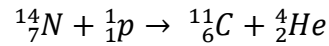


Figure 5: Principe de fonctionnement d'un cyclotron

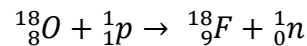
En ce qui concerne les principaux isotopes utilisés en TEP, ^{14}N , ^{18}O , ^{64}Ni et ^{89}Y sont les éléments stables utilisés dans la cible pour produire respectivement les radio-isotopes ^{11}C , ^{18}F , ^{64}Cu et ^{89}Zr .

Plus précisément, le carbone-11 est obtenu par bombardement de protons sur une cible composée d'azote-14 gazeux selon l'équation suivante :



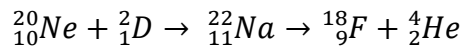
Le carbone-11 alors produit par le cyclotron se trouvera sous forme de dioxyde de [${}^{11}C$]carbone si la cible contient des traces d'oxygène. En revanche, si le gaz cible contient de l'hydrogène, le carbone-11 produit se trouvera sous forme de [${}^{11}C$]méthane.

Le fluor-18, sous forme d'ions [${}^{18}F$]F⁻, est produit par un bombardement de protons sur une cible d'eau enrichie en oxygène-18 (H₂[${}^{18}O$]O) selon l'équation suivante :

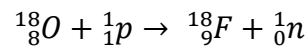


Cette réaction permet la production d'ions fluorures qui se trouvent en solution aqueuse en sortie du cyclotron. Il est également possible d'obtenir du fluor moléculaire sous forme de gaz [${}^{18}F$]F₂ soit par :

- Bombardement de deutons sur une cible de néon gazeux selon l'équation :



- Bombardement de protons sur du dioxygène enrichi en oxygène-18 ([${}^{18}O$]O₂) selon la réaction :



Un inconvénient de la production de [${}^{18}F$]F₂ est l'adsorption du fluor moléculaire sur la cible, rendant son extraction complexe. Pour remédier à ce problème, une faible quantité de fluor moléculaire non radioactif comme gaz entraîneur (environ 0,5% du volume de la cible) est introduit pour entraîner quantitativement le [${}^{18}F$]F₂. L'ajout de fluor-19 entraîne ainsi une dilution isotopique et donc une faible activité molaire (jusqu'à 0,35 GBq/μmol).

II.3.3.

Production de radioisotopes en France

Pour les besoins de l'imagerie TEP et du diagnostic clinique, la France compte 31 cyclotrons biomédicaux dédiés à la production de radioisotopes et de radiopharmaceutiques (Figure 6).²⁰ En effet, on compte aujourd'hui plus de 175 caméras TEP réparties sur l'ensemble du territoire français, et en 2022, c'est plus de 800.000 examens TEP qui ont été réalisés, tous traceurs confondus.²¹ Le traceur le plus utilisé reste de loin le [${}^{18}F$]FDG, représentant 89% des examens

TEP en 2022.

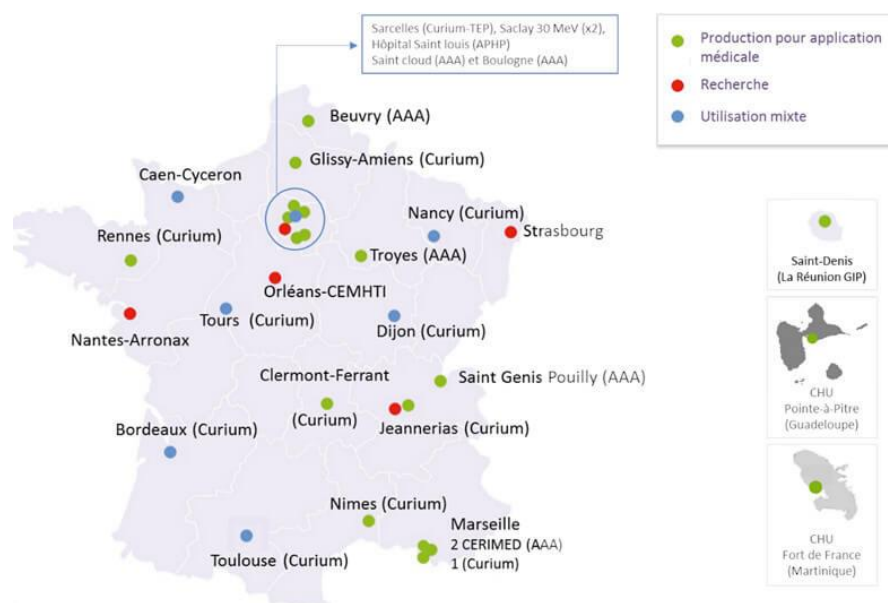


Figure 6: Répartition géographique des cyclotrons en France pour la production de radioisotopes²⁰

II.4. Imagerie TEP en oncologie

II.4.1. Radiopharmaceutiques utilisés actuellement en oncologie

Les radiopharmaceutiques possédant une autorisation de mise sur le marché (AMM) sont représentés en figure 7. Parmi eux, le [¹⁸F]fluoro-2-désoxy-D-glucose ([¹⁸F]FDG), un analogue du glucose, est le plus utilisé en imagerie TEP. Il a obtenu son AMM en 1998 et est utilisé en oncologie, cardiologie ainsi qu'en neurologie. Ce traceur est intégré par la plupart des cellules cancéreuses qui possèdent une forte activité métabolique lors de leur prolifération. Cela se traduit par une augmentation significative de leur consommation de glucose. Ainsi, le [¹⁸F]FDG est transporté dans les cellules cancéreuses, phosphorylé, mais ce métabolite radioactif n'est pas dégradé par les enzymes de la glycolyse, ce qui engendre une accumulation du traceur au niveau des tumeurs et permet donc leur visualisation.²²

La [¹¹C]Choline ainsi que son analogue fluoré, la [¹⁸F]Fluoro-choline, permettent quant à eux de réaliser le diagnostic des tumeurs de la prostate, ainsi que des tumeurs cérébrales.²³ En effet, étant un précurseur important de la synthèse de la membrane cellulaire phospholipidique, les cellules cancéreuses, dont l'activité métabolique est plus importante, consomment davantage de choline, engendrant une accumulation du traceur et permettant la visualisation de la tumeur.

La [¹¹C]Méthionine et la [¹⁸F]Fluoroéthyl-L-tyrosine sont deux traceurs utilisés pour le diagnostic de tumeurs cérébrales. En effet, ces traceurs, analogues d'acides aminés sont transportés à travers la barrière hémato-encéphalique et vont s'accumuler dans les cellules cancéreuses, plus demandeuses en acides aminés pour la synthèse de protéines et la prolifération.^{24,25}

La [¹⁸F]Fluorodihydroxyphénylalanine ([¹⁸F]FDOPA) est utilisée pour le diagnostic de tumeurs endocrines et cérébrales. Prise en charge par l'enzyme L-DOPA décarboxylase, elle permet d'imager toutes les perturbations liées au système dopaminergique.²⁶ Elle est aussi utilisée pour les maladies neurologiques telles que la maladie de Parkinson.

Le [¹⁸F]Fluoroestradiol ([¹⁸F]FES), analogue du ligand naturel estradiol, est un traceur qui se fixe sur les récepteurs aux œstrogènes. Il est utilisé pour le diagnostic de lésions liées au cancer du sein exprimant les récepteurs aux œstrogènes.²⁷

Plus récemment, le [⁶⁸Ga]PSMA-11 a été approuvé par l'EMA (European Medicine Agency) en 2019. Il intervient pour le diagnostic du cancer de la prostate. En effet, ce traceur marqué au gallium-68 cible les tumeurs surexprimant l'antigène spécifique membranaire de la prostate (PSMA). Il permet également d'évaluer l'agressivité de certaines tumeurs en fonction du niveau d'expression de ces protéines.²⁸

Enfin, le [⁶⁸Ga]DOTA-TATE permet d'imager les tumeurs neuroendocrines. Ce radiotracer est composé d'un peptide, l'octréotide (TATE) fonctionnalisé avec un macrocycle (DOTA) permettant la chélation du radiométal, ici le gallium-68. Ce peptide, analogue de la somatostatine, permet la visualisation de la surexpression des récepteurs de la somatostatine dans le cas de tumeurs malignes.²⁹ L'avantage de ce dernier traceur est la possibilité d'utiliser celui-ci comme agent théranostique, en chélatant un radiométal comme le lutétium-177, émettant des rayonnements (α et γ) capables de détruire spécifiquement les cellules cancéreuses auxquelles le traceur se fixe et s'accumule. Un exemple de médicament utilisé est le ¹⁷⁷Lu-DOTA0-Tyr3-Octreotate (¹⁷⁷Lu-DOTATATE) commercialisé sous le nom LUTATHERA®.

Nom	Radio-isotope	Diagnostic
[¹⁸ F]FDG	Fluor-18	Majorité de cellules cancéreuses
[¹¹ C]Choline/[¹⁸ F]Fluoro-choline	Fluor-18/Carbone-11	Cancer de la prostate/du foie
[¹¹ C]Méthionine	Carbone-11	Tumeurs cérébrales
[¹⁸ F]Fluoroéthyl-L-tyrosine	Fluor-18	Tumeurs cérébrales
[¹⁸ F]FDOPA	Fluor-18	Tumeurs endocrines et cérébrales
[¹⁸ F]Fluoroestradiol	Fluor-18	Récepteurs aux œstrogènes
[⁶⁸ Ga]PSMA-11	Gallium-68	Cancer de la prostate
[⁶⁸ Ga]DOTA-TATE	Gallium-68	Tumeurs neuroendocrines

Tableau 2: Principaux radiopharmaceutiques possédant une AMM en France et utilisés en oncologie

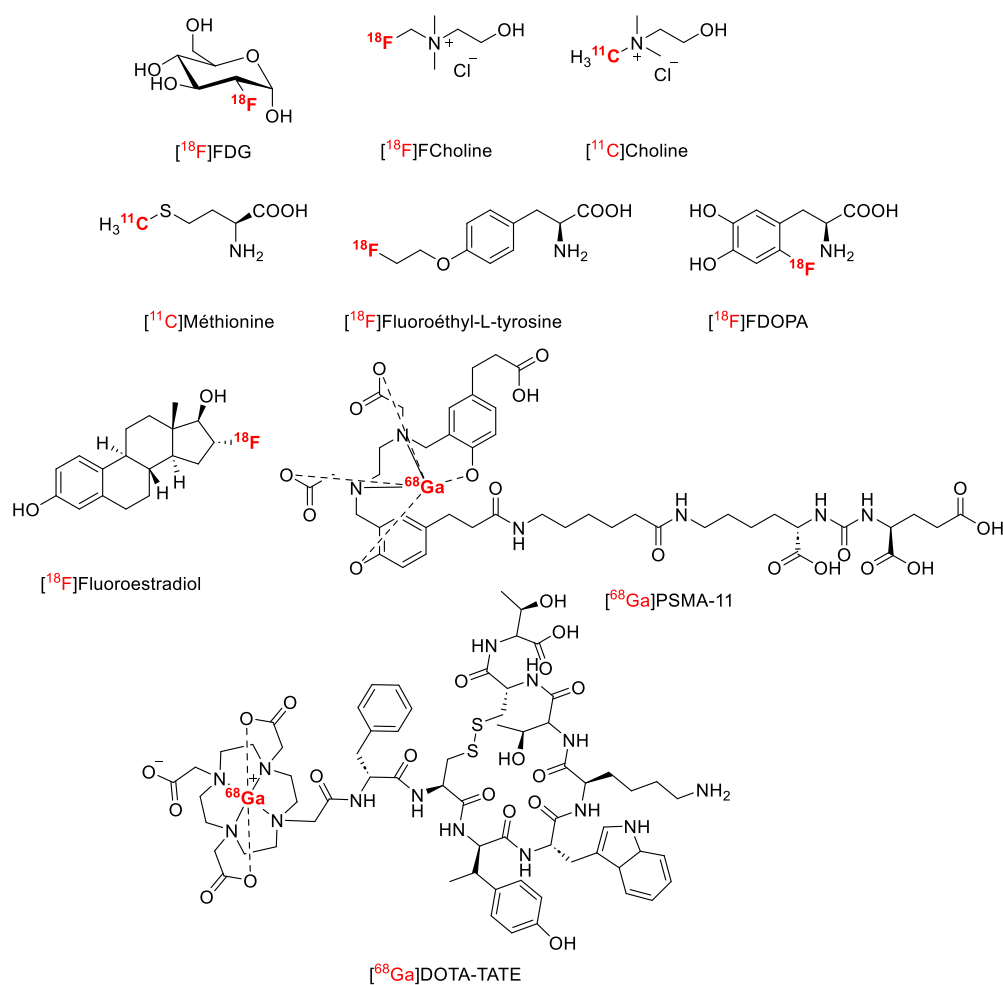


Figure 7: Radiopharmaceutiques disposants d'une autorisation de mise sur le marché en France

Si à l'origine les traceurs étaient des dérivés d'acides aminés, ou des petites molécules analogues aux ligands naturels de récepteurs, la médecine nucléaire se tourne aussi aujourd'hui vers l'utilisation d'anticorps spécifiques marqués avec des radioisotopes. On parle alors d'immunoTEP. A cause de leur temps de distribution plus long, d'autres isotopes à demi-vie plus longue comme le zirconium-89 ($t_{1/2} = 3,2$ jours) sont utilisés. Cette technique permet de combiner l'affinité et la spécificité de l'anticorps pour sa cible à la sensibilité de l'imagerie TEP.

Limitations et enjeux pour la médecine du futur

L'une des limitations majeures de l'imagerie TEP aujourd'hui réside dans le faible nombre de radiotraceurs disponibles. Le $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$, qui cible le métabolisme énergétique des cellules en croissance, reste de très loin le principal radiotraceur utilisé. Cependant, la surconsommation de glucose n'est pas spécifique aux cellules cancéreuses et cette non-spécificité est une faiblesse de ce traceur ; elle peut engendrer l'apparition de faux positifs. En effet, une activité glycolytique importante peut être due à des processus inflammatoires par exemple. Au contraire, certaines tumeurs ne sont pas détectables du fait de leur consommation de glucose limitée ou de leur faible taille.³⁰

C'est pourquoi la médecine du futur s'oriente vers l'utilisation complémentaire de traceurs plus spécifiques de certains biomarqueurs permettant de différencier les tumeurs. En effet, l'éventail de traceurs disponibles actuellement ne permet pas d'évaluer avec précision le type de cancer détecté lors d'un examen TEP, ni de rendre compte de l'hétérogénéité tumorale ou encore d'estimer le caractère agressif d'une tumeur. Il y a donc un fort besoin de développer de nouvelles molécules ciblant ces marqueurs d'agressivité, ou permettant d'évaluer la présence éventuelle de certaines protéines afin de stratifier les cancers pour évaluer leur stade de progression et orienter la stratégie thérapeutique dans une démarche de médecine personnalisée plus performante.³¹

Radiochimie des isotopes pour l'imagerie TEP

Radio-isotopes coordinants

Le marquage de structures moléculaires par un radiométal tel que le gallium-68, le cuivre-64 ~~ou~~ encore le zirconium-89 se fait par l'action d'une molécule complexante permettant la chélation du radio-isotope. Le chélatant choisi dépend du métal concerné. Par exemple, l'affinité du ^{68}Ga pour les ligands azotés ou oxygénés et la taille de l'ion orientera vers des ligands de type DOTA, NOTA ou HBED-cc par exemple (Figure 8). En ce qui concerne le ^{89}Zr , le chélatant de choix reste le ligand hexadentate siderophore desferrioxamine (DFO). Cependant les études de stabilité *in vivo* ont montré qu'une perte de chélation du radiométal était observée, ouvrant la voie à l'élaboration de nouveaux ligands analogues du DFO.³²

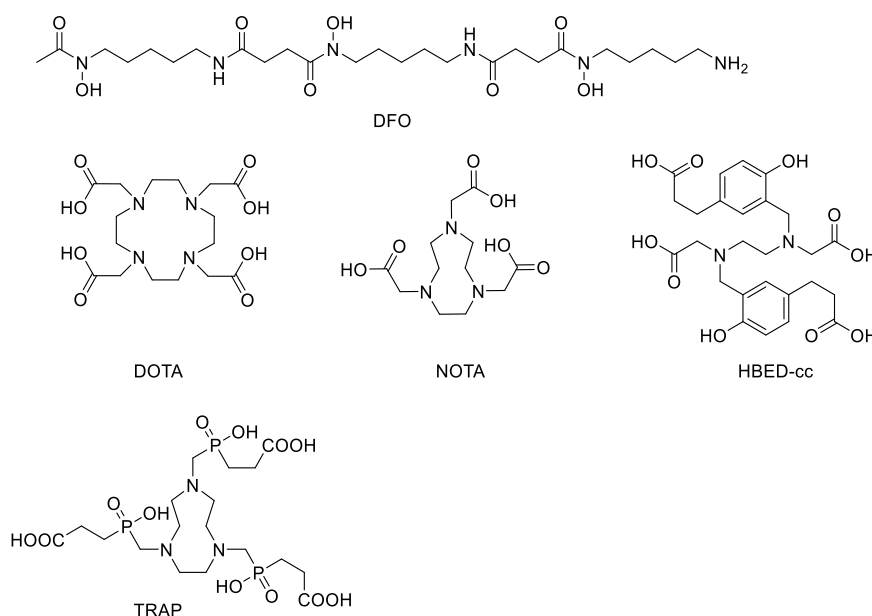


Figure 8: Principaux chélatants utilisés pour la complexation des radiométaux

En fonction du chélatant, la complexation peut être réalisée dans des conditions douces, à des températures peu élevées et proche du pH physiologique, des conditions compatibles avec le marquage de biomolécules (protéines ou anticorps par exemple). De nouveaux chélatants font également leur apparition et permettent des conditions de marquage en pH plus acides, à température ambiante et nécessitant moins de substrat comme le TRAP par exemple.³²

A titre d'exemple, le $[^{68}\text{Ga}]\text{PSMA-11}$ est un traceur utilisé en imagerie TEP pour la détection et le suivi du cancer de la prostate. Il est composé de l'antigène membranaire spécifique de la prostate (PSMA) fonctionnalisé avec un complexant, le HBED-cc (Schéma 1).³³

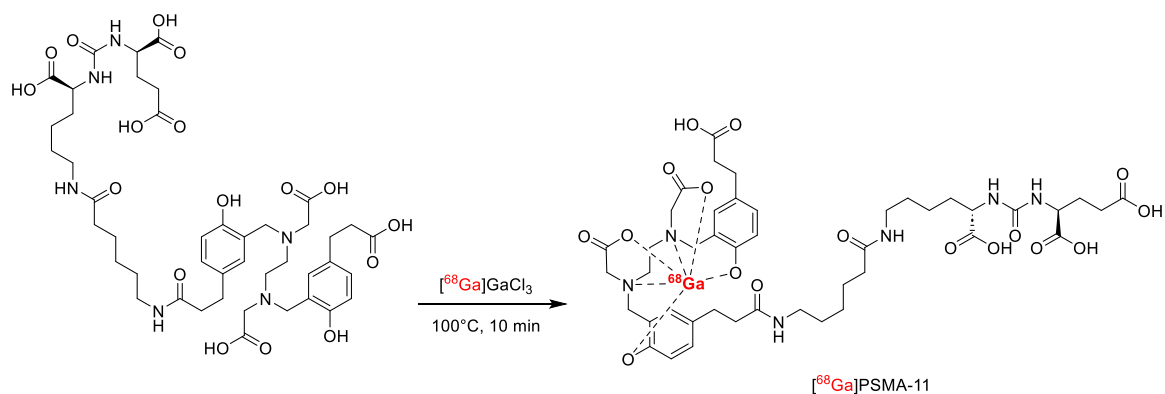


Schéma 1: Synthèse du $[^{68}\text{Ga}]\text{PSMA-11}$ ³⁴

Radioisotopes covalents

Il existe différents isotopes utilisés en imagerie TEP liés à des molécules d'intérêt de façon covalente, comme le ^{11}C ou encore le ^{18}F . Ces deux derniers sont les plus utilisés du fait de leur temps de demi-vie de 20,4 et 109,8 minutes respectivement, ainsi que de leurs propriétés chimiques facilitant leur incorporation sur des édifices moléculaires et permettant leur utilisation en imagerie.³⁵ L'isotope radioactif est généralement introduit lors de la dernière étape de synthèse, afin de limiter l'impact de la décroissance radioactive. Cependant, ce n'est pas systématiquement le cas. En effet, une étape de déprotection est parfois nécessaire lorsque la réactivité de la molécule considérée n'est pas compatible avec cette stratégie. Des stratégies prosthétiques multi-étapes sont aussi parfois envisagées pour le marquage de biomolécules au fluor-18.

II.5.2.1. Radiochimie du carbone-11

Le carbone-11 est un radio-isotope possédant des propriétés intéressantes pour l'imagerie TEP. Son schéma de désintégration produit presque uniquement des positons, offrant une excellente statistique de comptage radioactif. Son positon possède une énergie moyenne conduisant à une bonne résolution spatiale et sa demi-vie courte limite son impact dosimétrique tout en offrant la possibilité de réaliser deux séances d'imagerie sur un même patient dans une même journée. Il peut être produit à de hautes activités par des cyclotrons biomédicaux à partir d'azote gazeux, un matériau très bon marché (0,03 €/L), et ne nécessite pas de traitement post-irradiation. De plus, le carbone-11 est l'isotope idéal pour réaliser du marquage isotopique, c'est-à-dire sans

modification de la structure chimique de la molécule et donc sans modification de ses propriétés biologiques. En effet, le carbone étant l'élément le plus abondant des molécules organiques après l'hydrogène, chaque molécule peut en théorie être radiomarquée au carbone-11 sans modifier sa structure. Cette stratégie de marquage isotopique au carbone-11 est particulièrement adaptée au radiomarquage de médicaments, une stratégie utilisée à des fins de recherche pour des études pharmacocinétiques ou pour le développement de nouvelles molécules thérapeutiques.³⁶

A partir des précurseurs dits «primaires» produits dans le cyclotron, à savoir le $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ ou le $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$, il est possible d'obtenir un nombre considérable de synthons marqués au carbone-11, utilisés pour réaliser des réactions de marquage (Figure 9).³⁷ Les applications d'utilisation de ces précurseurs secondaires marqués au carbone-11 permettent ainsi d'accéder à un large éventail de réactions chimiques.

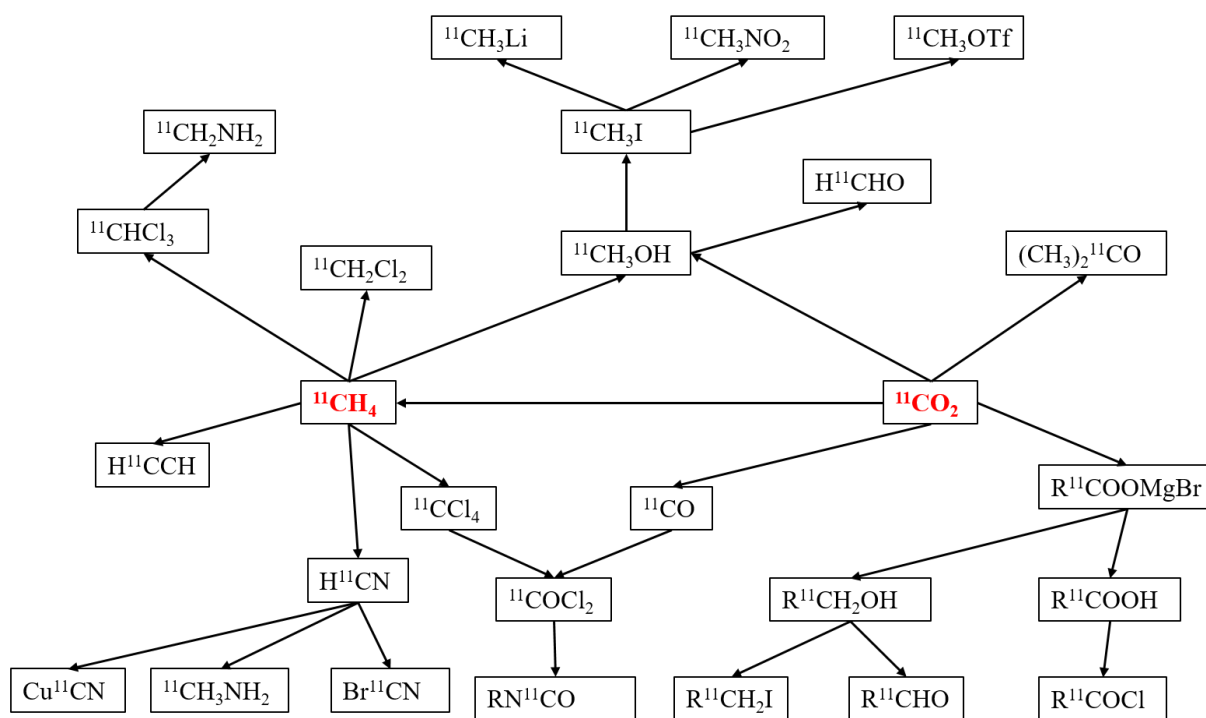


Figure 9 : Préparation des principaux précurseurs secondaires marqués au carbone-11 (tiré de Petroni *et al.*³⁸)

II.5.2.1.1. Réactions de méthylation

La grande majorité des radiomarquages au carbone-11 est réalisée *via* des réactions de N-, O- ou encore S-méthylation à partir de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ ou de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$, réactifs secondaires préparés

à partir du $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ produit par le cyclotron.³⁶ Le $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ peut-être obtenu de deux manières différentes : par voie dite « liquide » à partir de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ ou par voie « gazeuse » à partir de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$, ce dernier étant produit directement dans le cyclotron ou par réduction quantitative de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ (Schéma 2) .

En suivant la voie « liquide » développée par Langström et Lundqvist en 1976,³⁹ le $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ est réduit en $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OH}$ en présence de LiAlH_4 en solution dans le tétrahydrofurane (THF) ou dans l'éther diéthylique (Et_2O). Après une étape d'hydrolyse, le $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OH}$ est ensuite transformé en $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ par réaction avec une solution aqueuse d'acide iodhydrique puis distillé sous flux d'azote ou d'hélium en passant à travers des gardes de soude et P_2O_5 .

Une méthode « gazeuse » alternative à la voie « liquide » a été développée pour la production de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$. Elle implique la conversion de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ en $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ par réaction en phase gazeuse à très haute température ($750\text{ }^\circ\text{C}$) en présence de I_2 sublimé. Le $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ peut quant à lui être directement produit en cyclotron ou être obtenu par réduction quantitative de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ en présence d'hydrogène et d'un catalyseur au nickel chauffé à $400\text{ }^\circ\text{C}$. Un procédé en boucle a été mis au point permettant d'optimiser la conversion du $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ en $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ en passant par un piégeage du $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ sur une résine tandis que le $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ n'ayant pas réagi est de nouveau mis en contact avec de l'iode pour recommencer un cycle réactionnel. En fin de procédé, le $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ stocké sur la résine est libéré par chauffage.^{40,41}

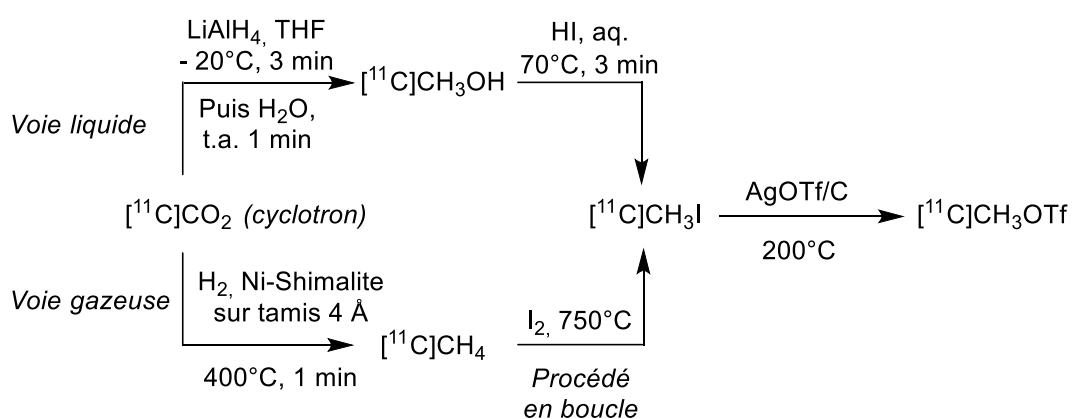


Schéma 2: Méthodes « liquide » et « gazeuse » de préparation de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ et $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ à partir du $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$

Si la méthode « liquide » offre en général de meilleurs rendements en $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ que la voie « gazeuse », cette dernière a longtemps été préférée pour ses activités molaires plus élevées. En effet, la présence de traces de méthanol dans les solutions de LiAlH_4 a longtemps empêché la

méthode « liquide » de proposer du $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ à haute activité molaire. Néanmoins, les progrès réalisés récemment sur la production de LiAlH_4 de très haute pureté ont relancé l'utilisation de cette méthode. Aujourd'hui, les fabricants d'automates de synthèse carbone-11 proposent aussi bien l'une ou l'autre méthode.

Qu'il soit obtenu par la voie « liquide » ou la voie « gazeuse », le $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ peut être transformé en $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$, agent de méthylation plus réactif permettant des temps de réactions plus courts, par réaction en présence de triflate d'argent adsorbé sur charbon et chauffé à 200°C .⁴²⁻⁴⁴

Les réactions de radiométhylation sont de loin les plus utilisées pour le radiomarquage au carbone-11. A titre d'exemple, la $[^{11}\text{C}]$ méthionine est utilisée pour réaliser l'imagerie des tumeurs cérébrales (Schéma 3).⁴² En effet, cet acide aminé essentiel est nécessaire à la synthèse des phospholipides et est surconsommé par les cellules tumorales. Il est préparé à partir du chlorhydrate de L-homocystéine thiolactone en présence de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ et d'hydroxyde de sodium dans l'éthanol à 85°C durant 5 min.⁴⁵

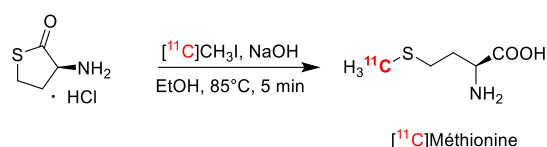


Schéma 3: Préparation de la $[^{11}\text{C}]$ Méthionine par *S*-méthylation

Autre exemple, le traceur $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ est très utilisé en recherche clinique pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer car cette molécule se fixe sur les plaques amyloïdes. Ce traceur est obtenu par méthylation d'un dérivé aniline par action du triflate de méthyle $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ à 75°C dans la 2-butanone (Schéma 4).⁴⁶

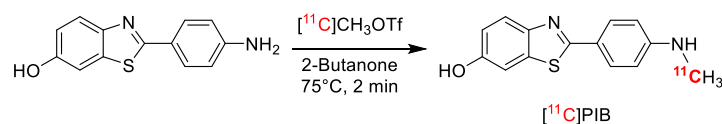


Schéma 4: Préparation du $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ par *N*-méthylation

Les réactions de radiométhylation sont très utilisées mais manquent de variété concernant les fonctions accessibles par ces méthodes. Ainsi, d'autres techniques de marquage se sont développées pour accéder à d'autres fonctions chimiques radiomarquées et ainsi élargir

l'éventail de traceurs disponibles.

II.5.2.1.2. Réactions de carboxylation

Bien que thermodynamiquement stable, le $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ produit par le cyclotron peut réagir en présence d'une base organique forte pour conduire à des motifs de type urées, carbamates ou acides carboxyliques marqués au carbone-11 sur la fonction carbonyle. A titre d'exemple, le $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ peut être fixé par une base forte comme le BEMP ou le DBU pour permettre, en présence de nucléophiles et de POCl_3 , la formation de carbamates ou urées mixtes (Schéma 5).⁴⁷ En effet, l'agent de fixation, ici la base B, va réagir avec le $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ pour conduire à l'intermédiaire **A** permettant l'addition d'un premier nucléophile et conduisant à la formation d'un acide carbamique **B**. En présence de POCl_3 , cet acide carbamique est déshydraté pour conduire à l'isocyanate **D** qui peut ensuite réagir avec un second nucléophile de type amine ou alcool pour conduire au composé **E** dissymétrique marqué au carbone-11 sur la fonction carbonyle

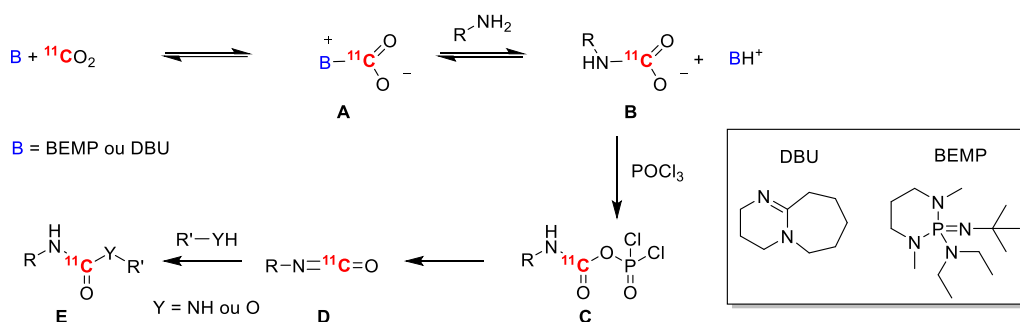


Schéma 5: Mécanisme de formation de $[^{11}\text{C}]$ urées et $[^{11}\text{C}]$ carbamates par fixation du $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$

Cette technique est notamment utilisée pour la production du composé $[^{11}\text{C}]\text{URB694}$, un inhibiteur de la « fatty acid amide hydrolase » (FAAH), enzyme intervenant dans le métabolisme des endocannabinoïdes et jouant un rôle dans les processus d'inflammation (Schéma 6).^{48,49} Ce traceur est produit en partant de la cyclohexylamine et du [1,1'-biphényl]-2,5-diol en présence de POCl_3 et de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$. Le groupe de Wilson *et al.* a obtenu le traceur désiré avec un rendement de 19% corrigé de la décroissance avec une activité molaire de 93 $\text{GBq}/\mu\text{mol}$.⁵⁰

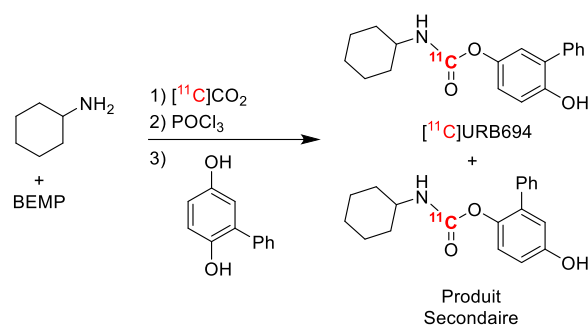


Schéma 6: Radiosynthèse du composé $[^{11}\text{C}]\text{URB694}$ par incorporation du $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$

Cependant, cette approche de piégeage du $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ nécessite l'utilisation de bases fortes qui ne sont pas toujours compatibles avec la structure de molécules complexes. Il existe d'autres méthodes pour accéder à des urées et des carbamates comme l'utilisation d'un imino phosphorane permettant le piégeage du $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ sous la forme d'un isocyanate permettant la formation d'urées et de carbamates par réaction de Staudinger suivie d'une réaction d'aza-Wittig.⁵¹⁻⁵³

Le $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ peut également être incorporé directement sur des structures moléculaires d'intérêt en passant par la fixation de ce dernier sur un organomagnésien. Cette approche a notamment été utilisée pour la radiosynthèse du $[^{11}\text{C}]\text{Ibrutinib}$, un inhibiteur de la tyrosine kinase de Bruton, impliquée dans la pathogénèse de plusieurs hémopathies malignes.⁵⁴ Son radiomarquage passe par le piégeage du $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ sur du bromure de vinylmagnésium, puis par une étape d'hydrolyse conduisant à l'acide acrylique marqué au carbone-11. Cet intermédiaire est alors soumis à une réaction de couplage avec une amine en présence de HATU et de DIPEA pour conduire au $[^{11}\text{C}]\text{Ibrutinib}$ avec un rendement de 5% non corrigé de la décroissance (Schéma 7).

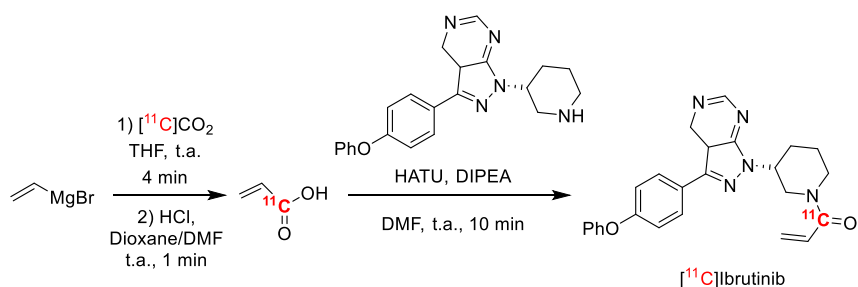


Schéma 7: Radiosynthèse du $[^{11}\text{C}]\text{Ibrutinib}$ par incorporation du $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$

II.5.2.1.3. Réactions de carbonylation

Une autre approche pour réaliser le marquage au carbone-11 de fonctions carbonyles est de réaliser des réactions de carbonylation en présence de monoxyde de carbone [^{11}C]CO, un réactif permettant la synthèse de diverses fonctions chimiques telles que des cétones, des amides, des acides carboxyliques ou encore des urées.^{55,56} Le [^{11}C]CO est préparé à partir du [^{11}C]CO₂ par passage au travers d'un tube de quartz contenant du zinc ou du molybdène à haute température (400 °C) sous courant de Xe, permettant une conversion en [^{11}C]CO d'environ 70%.^{56,57} Plus récemment, de nouvelles méthodes de conversion du [^{11}C]CO₂ en [^{11}C]CO ont émergé. Elles passent notamment par l'utilisation de dérivés lithium silylés ou bien de disilanes en présence d'une source d'ions fluorures comme le TBAF permettant une conversion rapide du précurseur primaire en monoxyde de carbone marqué avec des rendements allant jusqu'à 38%.^{58,59} Ces dernières années se développent également des réactions de réduction par voie électrochimique. En effet l'utilisation de trois électrodes combinées ainsi qu'un électrocatalyseur de type nickel (Ni(cyclam)²⁺) ou zinc (Zn(cyclen)²⁺) permet une conversion du [^{11}C]CO₂ en [^{11}C]CO en 5 minutes de réaction avec des conversions allant jusqu'à 6% à partir du [^{11}C]CO₂.⁶⁰ Enfin, de nouvelles méthodes se sont développées en utilisant des catalyseurs de zinc supportés sur particules de silice, permettant la conversion du [^{11}C]CO₂ en [^{11}C]CO avec des rendements de 93%.⁶¹

Le [^{11}C]CO ainsi formé est ensuite utilisé dans des réactions de carbonylation nécessitant l'utilisation de complexes métalliques, le plus souvent au palladium. Cette approche a été utilisée pour le radiomarquage du [^{11}C]Raclopride, un antagoniste des récepteurs D2/D3 à la dopamine. Cette synthèse passe par l'addition oxydante du 4,6-dichloro-2-iodo-3-méthoxyphénol sur du palladium bisdibenzilidèneacétone en présence de XantPhos et conduit au complexe **F**. L'incorporation du [^{11}C]CO suivi d'une réaction avec la (*S*)-éthylpyrrolidin-2-yl)éthanamine conduit à l'obtention du [^{11}C]Raclopride avec un rendement de 57% comparable à celui obtenu par méthylation de la fonction hydroxyle du groupement phénol (Schéma 8).⁶²

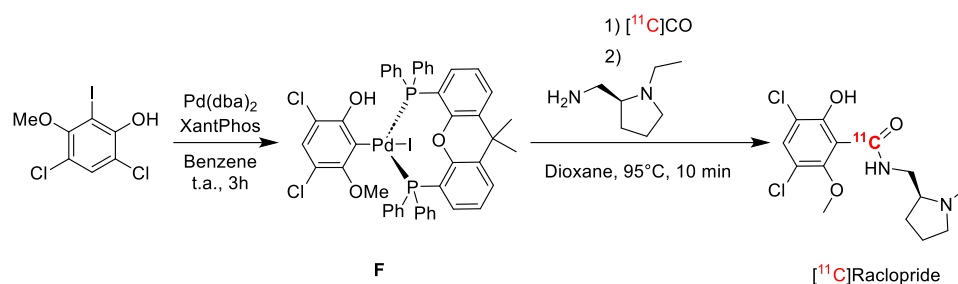


Schéma 8: Radiosynthèse du $[^{11}\text{C}]$ Raclopride *via* l'incorporation de $[^{11}\text{C}]\text{CO}$

II.5.2.1.4. Réactions de cyanation

La fonction nitrile est un autre groupement chimique pouvant être radiomarqué au carbone-11. Ainsi, des stratégies de marquage ont été développées pour réaliser des réactions de cyanation, le plus souvent sur des structures aromatiques, en utilisant $\text{H}[^{11}\text{C}]\text{CN}$ comme précurseur secondaire de marquage. Ce dernier est produit à partir du $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ en présence d'ammoniac et de platine chauffé à 900°C .⁶³ Plus récemment, une méthode photocatalytique a été développée permettant l'incorporation d'un groupement nitrile marqué au carbone-11 sur des noyaux aromatiques riches en électrons. Cette méthode de C-H activation radicalaire passe par l'utilisation d'un catalyseur de type acridinium. Cette technique permet le marquage de nombreux aromatiques enrichis en électrons avec d'excellents rendements en cyanation aromatique.^{64,65}

A titre d'exemple, la $[^{11}\text{C}]$ Vilazodone a été synthétisée par radiocyanation pallado-catalysée par le groupe de Lee *et al.*⁶⁶ avec un rendement de 33% corrigé de la décroissance et une activité molaire de $148\text{ GBq}/\mu\text{mol}$ (Schéma 9).

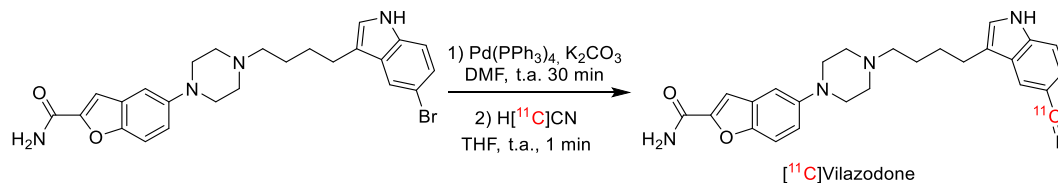


Schéma 9: Radiosynthèse de la $[^{11}\text{C}]$ Vilazodone par radiocyanation pallado-catalysée

II.5.2.1.5. Réactions de trifluorométhylation

On retrouve le motif CF_3 dans de nombreux composés pharmaceutiques du fait de ses propriétés pharmacologiques intéressantes notamment en ce qui concerne la stabilité métabolique.⁶⁷ Ce groupement pourrait ainsi représenter un réel intérêt pour le marquage isotopique de pharmacophores au carbone-11. Le groupe de Haskali *et al.*⁶⁸ a développé une méthode de marquage de ce groupement trifluorométhyle au carbone-11. En effet, grâce à l'utilisation de CoF_3 dans un four à 270 °C, le $[^{11}\text{C}]$ méthane est converti en $[^{11}\text{C}]\text{CHF}_3$. Par action du bromure de cuivre, ce précurseur peut être transformé en $[^{11}\text{C}]\text{CuCF}_3$, réactif électrophile permettant la fonctionnalisation d'aromatiques par exemple. Cette méthode de trifluorométhylation au carbone-11 nécessite cependant plusieurs étapes de synthèse et reste donc difficile à appliquer au radiomarquage de molécules d'intérêt biologique du fait de la courte demi-vie de l'isotope.

En conclusion, bien que plusieurs précurseurs secondaires pour le radiomarquage au carbone-11 aient été développés, la plupart des radiomarquages avec cet isotope restent issus de méthylations. Le carbone-11 souffre notamment de sa courte demi-vie qui est un frein aussi bien pour le développement de techniques de marquage efficaces que pour la distribution des radiotraceurs marqués avec cet isotope. Bien que le carbone-11 reste un isotope intéressant pour la recherche notamment grâce aux possibilités de marquage isotopique plus importantes, le fluor-18 reste aujourd'hui le radio-isotope le plus utilisé en imagerie TEP.

II.5.2.2. Radiomarquages au fluor-18

Le fluor-18 possède des propriétés presque idéales pour l'imagerie TEP. Sa demi-vie de 109,8 minutes est suffisamment longue pour faciliter les réactions de marquage et pour permettre sa distribution et donc son industrialisation mais suffisamment courte pour limiter son impact dosimétrique. L'énergie moyenne de son positon permet une bonne résolution spatiale et son schéma de désintégration produit presque uniquement des positons (97%). Il est relativement facile à produire, le plus souvent à partir d'une cible liquide d'eau enrichie en oxygène-18, un matériau à un coût abordable (env. 35 €/mL en 2023) ne nécessitant pas de traitement post-irradiation. Le fluor-18 est également un bon isotope pour le marquage isotopique puisqu'environ 20% des molécules thérapeutiques possèdent un atome de fluor.⁶⁹ De plus, le fluor est un bioisostère de l'atome d'hydrogène, il offre donc des propriétés intéressantes en remplacement de celui-ci, notamment pour accroître la stabilité métabolique ainsi que ses

propriétés de distribution *in vivo*.⁷⁰ Le fluor améliore également la stabilité chimique de la molécule avec une énergie de liaison C-F plus forte que la liaison C-H et une résistance à l'oxydation.⁷¹ Ainsi, du fait de ces propriétés intéressantes dans le domaine pharmaceutique ainsi que de la facilité de produire du fluor-18 en grandes quantités, le radiomarquage au fluor-18 a suscité un vif intérêt dans la communauté scientifique. C'est pourquoi de nombreuses méthodes de radiosynthèse ont été développées pour incorporer ce radioisotope dans un large spectre de molécules d'intérêt biologique. En raison de son temps de demi-vie plutôt court, l'accent a été mis sur le développement d'approches radiosynthétiques qui introduisent l'isotope radioactif souvent en dernière étape selon deux principales approches, la fluoration électrophile et la fluoration nucléophile.

II.5.2.2.1. Réactions de fluoration électrophile

Historiquement, le fluor-18 a d'abord été produit sous la forme de gaz $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$. Cet agent de fluoration a alors été utilisé pour réaliser les premières réactions d'addition ou de substitution électrophile sur des composés riches en électrons tels que des composés (hétéro)aromatiques ou des alcènes. C'est ainsi qu'a été réalisée la toute première synthèse du $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ mise au point en 1978 (Schéma 10).⁷²

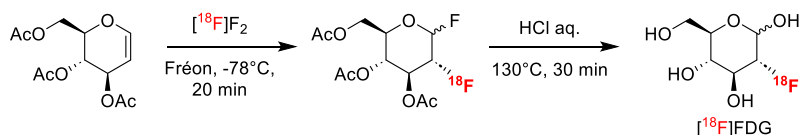


Schéma 10: Synthèse historique du $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ par fluoration électrophile

Un désavantage majeur de cette approche est le manque de régiosélectivité.⁷³ D'autres méthodes de fluoration ont alors été développées, en particulier des réactions de fluorodémétallation à partir de précurseurs organométalliques, leur effet inductif donneur permettant d'augmenter la densité électronique sur le site de fluoration pour contrôler la régiosélectivité.⁷⁴

Afin d'augmenter la réactivité du fluor électrophile tout en conservant la régiosélectivité, des précurseurs secondaires ont été synthétisés à partir du $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$. C'est le cas de la préparation du $[^{18}\text{F}]\text{Selectfluor}$ ou du $[^{18}\text{F}]\text{NFSI}$ par exemple. A titre d'exemple, le $[^{18}\text{F}]\text{Selectfluor}$ a été utilisé

par le groupe de Solin *et al.*⁷⁵ pour la synthèse du [¹⁸F]Fluoro-marsanidine, un traceur qui permet l'imagerie des α_2 -adrenorécepteurs jouant un rôle dans la régulation neuronale (Schéma 11). Le traceur est obtenu avec un rendement de 6% à partir du précurseur secondaire [¹⁸F]Selectfluor.

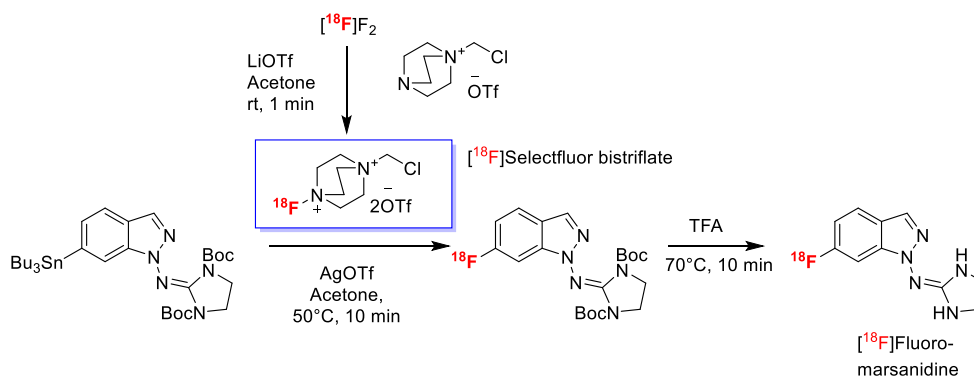


Schéma 11: Radiosynthèse du [¹⁸F]Fluoro-marsanidine *via* l'utilisation du [¹⁸F]Selectfluor bistriflate

Néanmoins, les fluorations électrophiles restent peu utilisées aujourd'hui pour de multiples raisons. En particulier, la production de [¹⁸F]F₂ nécessite l'emploi de F₂ non radioactif (gaz entraîneur) pour limiter l'adsorption du gaz sur les parois de la cible du cyclotron. Ceci entraîne une dilution isotopique dégradant l'activité molaire du fluor-18. Bien qu'une méthode électrochimique de production de [¹⁸F]F₂ à haute activité molaire à partir de [¹⁸F]F⁻ ait été développée, les fluorations électrophiles sont aujourd'hui délaissées au profit des fluorations nucléophiles à partir d'ions fluorures [¹⁸F]F⁻.⁷⁶

II.5.2.2.2. Réactions de fluorations nucléophiles

II.5.2.2.2.1. Réactivité de l'ion fluorure [¹⁸F]F⁻

Grâce à sa richesse électronique, l'ion fluorure est un bon nucléophile pouvant par exemple être utilisé dans des réactions de substitution nucléophile (S_N) avec des substrats aliphatiques ou aromatiques.⁷⁷ Mais cette richesse électronique est aussi un handicap. En effet, les ions fluorures [¹⁸F]F⁻ sont produits à partir d'une cible liquide d'eau enrichie en oxygène-18. L'ion fluorure est fortement solvaté par la formation de liaisons hydrogène en milieu aqueux, ce qui diminue drastiquement sa nucléophilie. Les ions [¹⁸F]F⁻ doivent donc presque systématiquement subir une première étape de déshydratation afin d'obtenir des ions fluorures

anhydres, et donc beaucoup plus réactifs. La technique la plus courante consiste à passer le contenu de la cible provenant du cyclotron sur une résine échangeuse d'anions (le plus souvent de type « Quaternary Methyl Ammonium », QMA) qui permet le piégeage des ions fluorures sur la résine et d'éliminer l'eau enrichie en oxygène-18 restante qui peut être recyclée (Schéma 12). L'élué des ions $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ depuis la résine est ensuite réalisée par une solution contenant un anion (le plus souvent des ions carbonate sous la forme de K_2CO_3) dans un mélange d'acétonitrile et d'eau. L'ajout d'eau, en plus faible proportion que le contenu initial de la cible (100-300 μL contre 1-2 mL), est nécessaire pour la bonne solubilisation des anions carbonate et fluorure. Bien souvent, dans le but d'augmenter la nucléophilie des ions $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$, un cryptant est ajouté à cette solution d'élué. Il permet la chélation du contre-ion présent. Le Kryptofix (K_{222}) est utilisé dans le cas le plus courant du potassium (Schéma 12). Il permet également d'augmenter la solubilité du fluorure de potassium, insoluble dans les solvants aprotiques. Est alors obtenu le complexe $\text{K}[^{18}\text{F}]\text{F}-\text{K}_{222}$, réactif clé le plus couramment utilisé pour les réactions de fluoration nucléophile. Puisqu'un volume d'eau est nécessaire afin d'éluer les ions fluorures de la résine, une dernière étape d'évaporation azéotropique réalisée à haute température (100-120 $^\circ\text{C}$) et sous vide permet d'obtenir ce complexe $\text{K}[^{18}\text{F}]\text{F}-\text{K}_{222}$ anhydre et prêt pour des réactions de fluoration nucléophiles.^{35,71,78,79}

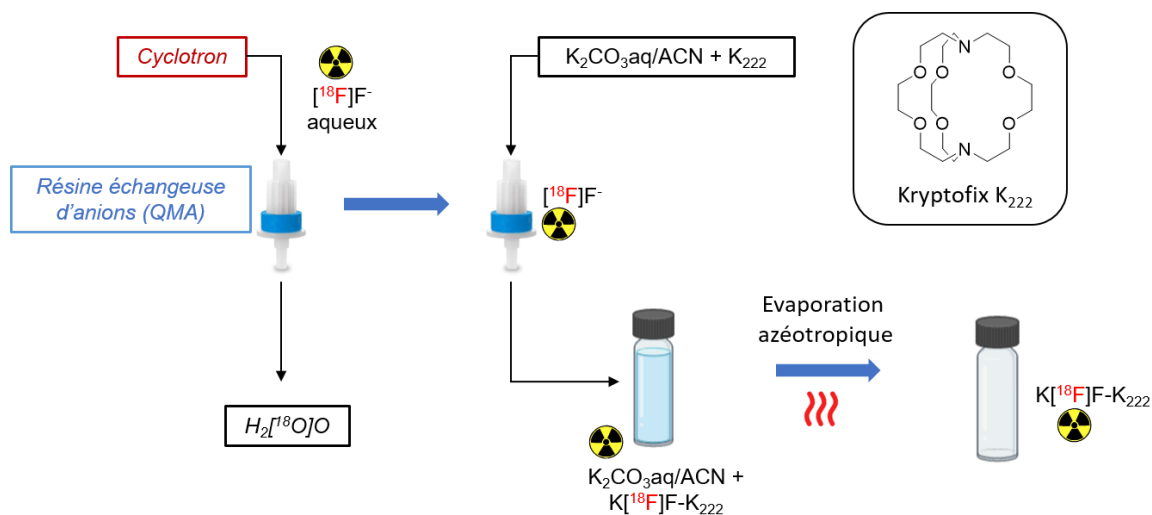


Schéma 12 Production du complexe $\text{K}[^{18}\text{F}]\text{F}-\text{K}_{222}$ à partir des ions $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ provenant du cyclotron

II.5.2.2.2. Réactions de S_N aliphatiques

En série aliphatique, les réactions de substitution nucléophile utilisent un groupement partant selon un mécanisme de type 2 ($\text{S}_\text{N}2$).⁸⁰ De nombreux groupements partants ont été utilisés

comme les halogènes, possédant une réactivité dans l'ordre $I > Br > Cl \gg F$.⁸¹ Différents sulfonates peuvent aussi être utilisés comme les groupements mésylate, nosylate, triflate ou encore tosylate.⁸² Ce dernier est l'un des plus utilisés car sa préparation est aisée à partir de l'alcool correspondant et qu'il offre une bonne séparation avec la molécule finale fluorée en vue de l'étape de purification par chromatographie liquide à hautes performances (HPLC). Ils présentent également un avantage quant à la facilité de préparation des précurseurs à partir des alcools correspondants. Cette stratégie de marquage passant par une réaction de type S_N2 offre généralement de bons rendements de marquage mais présente aussi plusieurs contraintes. En effet, il faut s'assurer de la bonne stabilité du précurseur en conditions basiques utilisées pour le radiomarquage.⁸³ Ainsi, plus le groupement partant est labile, plus une élimination en conditions basiques risque d'avoir lieu.⁸²

Par exemple, la radiosynthèse du [^{18}F]DPA-714, composé ciblant la « translocator protein » (TSPO) pour l'imagerie TEP de la neuroinflammation, est réalisée par S_N2 à partir d'un dérivé tosylate en présence du complexe $K[^{18}F]F/K_{222}$ et de carbonate de potassium à 160°C durant 5 minutes dans le DMSO (Schéma 13).⁸⁴ Le [^{18}F]DPA-714 est obtenu avec des rendements corrigés de la décroissance de $30 \pm 5\%$ et une activité molaire de l'ordre de 150 GBq/ μ mol.

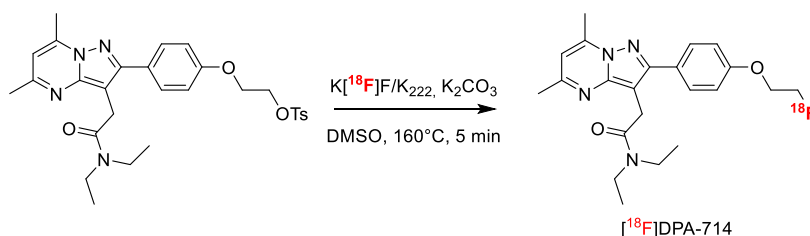


Schéma 13: Radiosynthèse du [^{18}F]DPA-714 par S_N2 depuis un composé de type tosylate

II.5.2.2.3. Réactions de S_N aromatiques

Le complexe $K[^{18}F]F/K_{222}$ permet également d'effectuer des réactions de substitution nucléophile aromatique (S_NAr) sur des composés aromatiques appauvris en électrons par des groupements électroattracteurs (CN, CO, CHO, CO_2R pour les plus communs) afin de favoriser le mécanisme d'addition-élimination.⁷¹ Le composé doit également posséder un groupement partant de type nitro, halogène ($F > Cl > Br \gg I$) ou ammonium quaternaire en positions *ortho* ou *para* du groupement électroattracteur pour stabiliser l'intermédiaire de Meisenheimer formé suite à l'addition du fluor sur le noyau aromatique.^{85,86}

A titre d'exemple, la radiosynthèse du [^{18}F]AF-FDI, traceur ciblant le Fork Head Box Transcription Factor (FOXM1), une protéine impliquée dans la réplication cellulaire et considérée comme oncogène, est réalisée à partir d'un composé triméthylammonium en présence du complexe $\text{K}[^{18}\text{F}]\text{F-K}_{222}$ et de carbonate de potassium dans l'acétonitrile à 130°C durant 15 minutes. Le traceur est alors obtenu avec un rendement de 73% avec une activité molaire de $5,5 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ (Schéma 14).⁸⁷

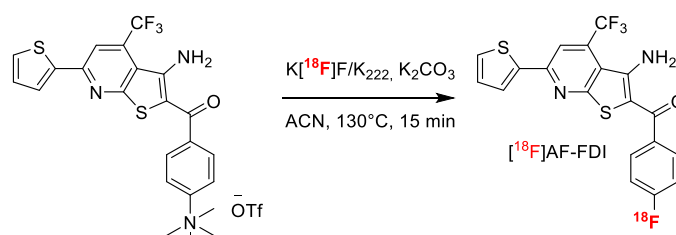


Schéma 14: Radiosynthèse du [^{18}F]AF-FDI par substitution nucléophile aromatique à partir d'un ammonium quaternaire

La présence de groupements électroattracteurs n'est pas toujours indispensable pour le marquage de composés hétéroaromatiques. En effet, certaines positions sont favorables à une substitution nucléophile par des ions [^{18}F]F $^-$. C'est le cas de la position 2 de la pyridine, qui, fonctionnalisée avec un groupement partant, permet une bonne voire excellente incorporation du fluor-18 du fait de l'intermédiaire de Meisenhemer généré favorablement lors de la réaction de $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$.⁸⁸ C'est le cas pour la synthèse du composé [^{18}F]Flortaucipir (AV1451) qui est utilisé pour cibler la protéine Tau dans le cadre de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer par exemple.⁵⁴ Le marquage de cette structure s'effectue dans des conditions standards de radiofluoration en présence du complexe $\text{K}[^{18}\text{F}]\text{F-K}_{222}$, et de carbonate de potassium à 130°C durant 10 minutes dans le DMSO et conduit au produit [^{18}F]AV1451 avec un rendement de 14% non corrigé de la décroissance (Schéma 15).

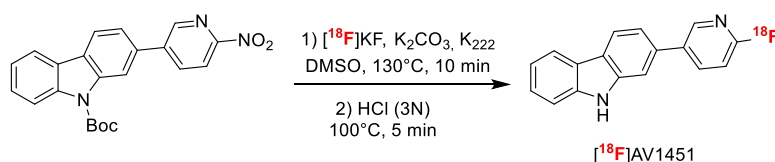


Schéma 15: Radiosynthèse du [^{18}F]AV1451 par $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ en position 2 d'un noyau pyridine

Hormis dans le cas de certains composés hétéroaromatiques, les réactions de $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ ne fonctionnent que sur des composés aromatiques appauvris en électrons, ce qui limite

grandement la faisabilité des marquages sur une large gamme de structures. C'est pourquoi, de nouvelles méthodes de marquages ont été développées pour pallier cette difficulté et ainsi réaliser le radiomarquage au fluor-18 de molécules aromatiques riches en électrons.

II.5.2.2.4. Réactions de S_NAr en présence d'iode hypervalent

Les sels d'iodonium sont des composés possédant un atome d'iode hypervalent qui peuvent être utilisés pour le radiomarquage de structures aromatiques qui ne sont pas appauvries en électrons. Ce sont des composés ioniques où l'atome d'iode est lié de façon covalente à deux groupements carbonés aromatiques.^{89,90} Un échange d'anions est d'abord réalisé entre le contre-ion du sel d'iodonium et l'ion [¹⁸F]F⁻ suivi d'une addition nucléophile sur un des aromatiques lié à l'iode, concertée avec l'élimination de l'iodure d'aryle correspondant. La géométrie spatiale particulière des sels d'iodonium facilite le recouvrement orbitalaire entre l'ion fluorure et la position de marquage sur le noyau aromatique, permettant ainsi la réaction.

Ainsi, l'utilisation de sels d'iodonium a permis d'améliorer la radiosynthèse de la [¹⁸F]FDOPA, l'un des traceurs les plus utilisés en imagerie TEP notamment pour le diagnostic de maladies neurodégénératives ou de tumeurs cérébrales.⁹¹ Jusque-là synthétisée par fluoration électrophile avec des rendements de l'ordre de 20%,²⁶ la radiosynthèse développée par Maisonial-Besset *et al.* à partir d'un sel d'iodonium permet d'obtenir la [¹⁸F]FDOPA avec des rendements corrigés de la décroissance compris entre 27 et 38% et une activité molaire comprise entre 170 et 230 GBq/μmol (Schéma 16).⁹²

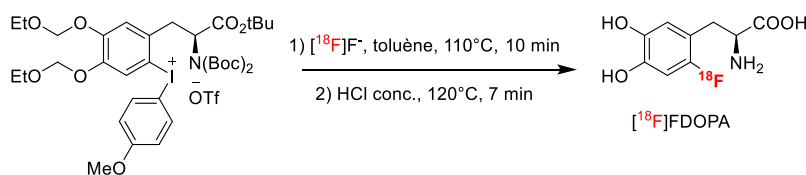


Schéma 16: Radiosynthèse de la [¹⁸F]FDOPA à partir d'un sel d'iodonium

En plus des sels de diaryliodoniums, les ylures d'iode permettent également le marquage de structures aromatiques riches en électrons, offrant dans certains cas de meilleures conversions par rapport à l'utilisation de sels d'iodonium.⁹³

Néanmoins, l'utilisation de dérivés d'iode hypervalent dans un contexte de radiofluorination

nécessite souvent de chauffer à haute température (>150 °C). Ces conditions de réaction assez dures ne sont donc pas compatibles avec le marquage de toutes les molécules. On peut également ajouter la faible stabilité des précurseurs ainsi que les difficultés de leur synthèse comme frein au développement de ce type de molécule.

II.5.2.2.5. Réactions de S_NAr concertée

Toujours dans l'objectif de réaliser des radiofluorations sur des composés aromatiques riches en électrons, le concept de S_NAr concertée a été introduit par le groupe de Ritter et fait appel à une réaction de déoxyfluoruration de phénols activés sous forme de sels d'uronium.⁹⁴ La synthèse de ce type de composés passe par une étape de pré-activation avec du phénofluor afin de former un sel d'uronium. Le groupe de Ritter a alors proposé un mécanisme selon lequel la paire d'ions formerait un intermédiaire tétraédrique par addition des ions fluorures sur le dérivé imidazolium. Cet intermédiaire se réarrangerait alors afin de former l'aromatique fluoré et la libération concomitante d'une imidazolone (Schéma 17).

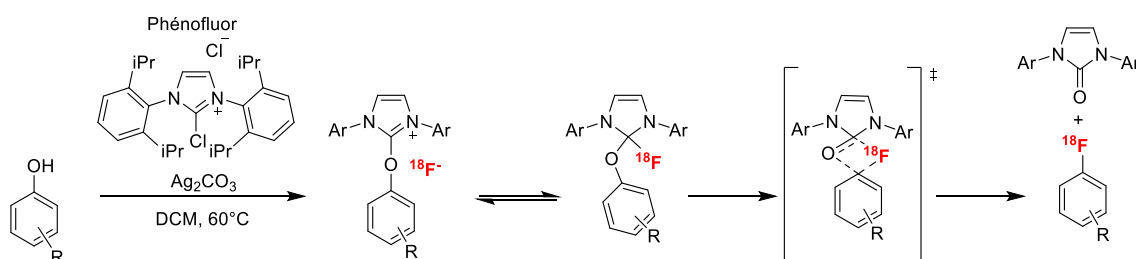


Schéma 17: Mécanisme de déoxyfluoruration concertée décrit par le groupe de Ritter⁹⁴

Cette technique a été utilisée pour le marquage d'un ensemble de composés aromatiques comme le 4-(5-([¹⁸F]fluoropyrimidin-2-yl)phénol qui est obtenu à partir de l'alcool correspondant avec un rendement de 86% (Schéma 18). A cause de sa complexité synthétique, cette méthode de marquage reste peu utilisée aujourd'hui malgré l'intérêt qu'elle suscitait du fait de la possibilité de radiomarquer n'importe quelle structure possédant un groupement phénol.

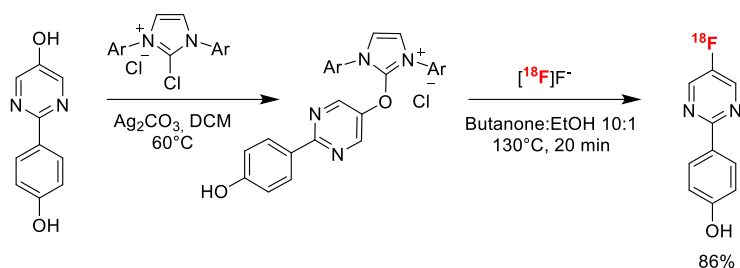


Schéma 18: Radiosynthèse du 4-(5-([¹⁸F]fluoropyrimidin-2-yl)phénol) par déoxyfluoruration

Quelques années après, le groupe de Ritter a décrit une modification de cette méthode de marquage par déoxyfluoruration en y introduisant l'utilisation de complexes de ruthénium.⁹⁵ Cette technique a permis le radiomarquage de structures riches en électrons en présence du complexe [CpRu(cod)Cl]. Le mécanisme est très similaire à celui décrit précédemment et offre d'excellentes conversions. Cependant, cette méthode est difficile à mettre en œuvre car le complexe de ruthénium n'est pas commercial et doit être préparé en milieu anhydre strict et sous atmosphère inerte en boîte à gants. Cette méthode ne s'est donc pas étendue à d'autres laboratoires.

Face aux limitations des techniques précédemment présentées, d'autres méthodes ayant recours à l'utilisation de catalyseurs métalliques ont également vu le jour pour permettre le marquage de structures riches en électrons et offrir de nouvelles possibilités.

II.5.2.2.6. Réactions de radiofluoruration en présence de complexes métalliques

En 2011, les groupes de Hooker et Ritter ont décrit l'utilisation de complexes de palladium (IV) pour des réactions de radiofluoruration.⁹⁶ Ces complexes électrophiles permettent, en présence d'ions [¹⁸F]F⁻, la formation d'un complexe Pd^{IV}-¹⁸F qui joue le rôle de source de fluor électrophile par inversion de polarité. Cet intermédiaire, chauffé en présence d'un autre complexe de palladium (II) portant le noyau aromatique à radiomarquer, permet alors la réaction de fluoruration par transmétallation entre les deux complexes de palladium. Une dernière étape d'élimination réductrice permet l'obtention de l'aromatique marqué au fluor-18. Cette méthode a été reprise par Lee *et al.*⁹⁶ pour la synthèse du fluorodeoxyestrone en deux étapes avec un rendement de 33% (Schéma 19).

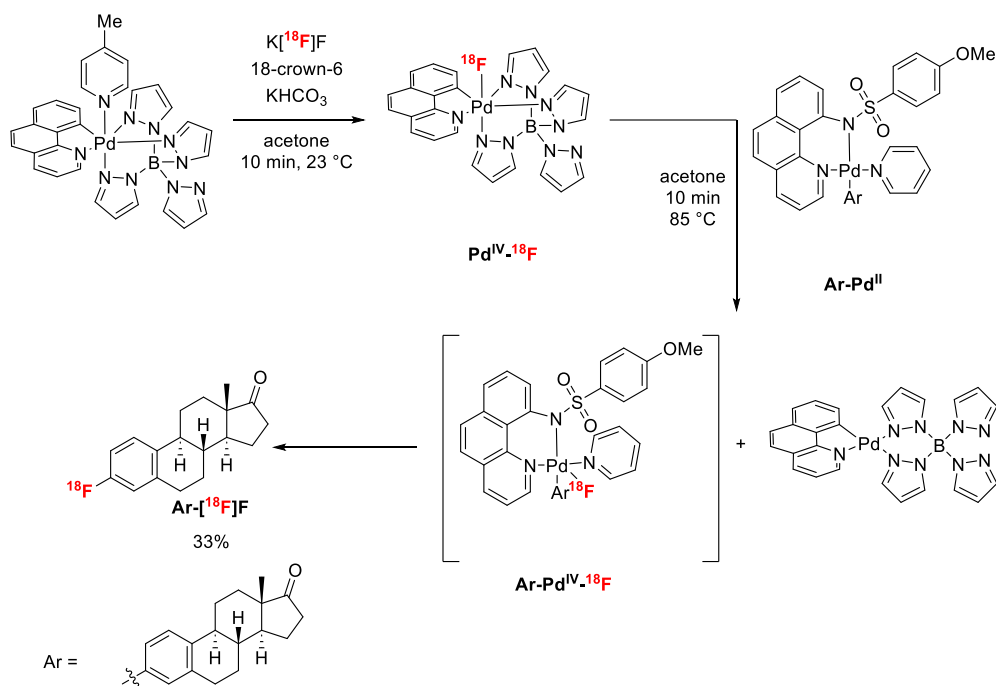


Schéma 19: Méthode de fluoration aromatique à partir de complexes de Pd^{IV}

Le même groupe a développé un peu plus tard une méthode similaire en utilisant des complexes de nickel à la place du palladium, qui offriraient de meilleurs résultats avec des temps de réaction très courts.⁹⁷ Néanmoins, ces méthodes au palladium ou au nickel nécessitent l'utilisation d'une boîte à gants pour synthétiser les complexes métalliques et sont donc très peu utilisées.

D'autres réactions de fluoration aromatique en présence d'un complexe de cuivre (II) ont été développées par le groupe de Gouverneur⁹⁸ à partir d'acides ou d'esters boroniques et utilisant un couplage de type Chan-Lam.⁹⁹ Le mécanisme réactionnel n'a pas été clairement élucidé mais les groupes de Sandford et Gouverneur ont émis quelques hypothèses (Schéma 20). Lors de la première étape, le complexe de cuivre pourrait subir un échange de ligand entre un groupement triflate et un ion $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ (A). Le complexe $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-}^{18}\text{F}$ alors formé pourrait intervenir dans une étape de transmetalation avec le composé d'intérêt boroné conduisant à un intermédiaire $\text{Ar-Cu}^{\text{II}}\text{-}^{18}\text{F}$ (B). Le complexe obtenu subirait une étape d'oxydation du cuivre II en cuivre III (C).¹⁰⁰ Les auteurs émettent l'hypothèse d'une oxydation par le dioxygène présent dans l'air. Le complexe de cuivre III peut subir une réaction d'élimination réductrice libérant l'aromatique fluoré ainsi que du triflate de cuivre I (D). Enfin, le cuivre pourrait subir une étape de réoxydation en cuivre II permettant la fermeture du cycle catalytique (E). Cependant, le complexe de cuivre est généralement introduit en excès par rapport au précurseur boroné. Ainsi, sa régénération n'est

pas une étape limitante au couplage.

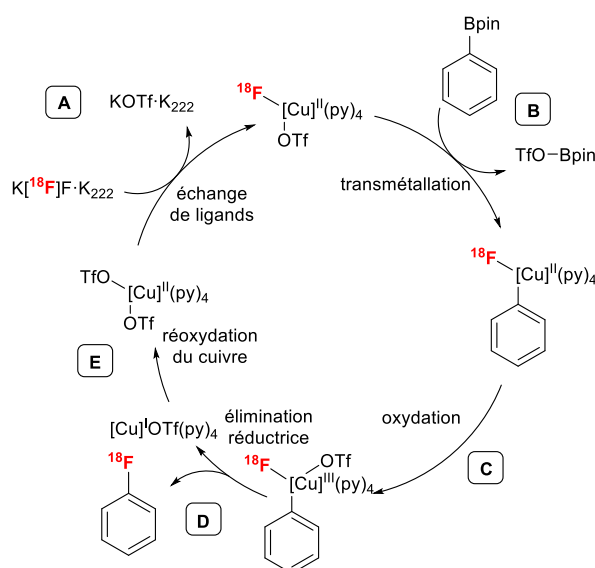


Schéma 20: Mécanisme proposé du couplage de Chan-Lam utilisant un complexe de cuivre

Le catalyseur $[\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{Py})_4]$ commercial possède l'avantage d'être soluble dans le milieu réactionnel et facilite donc l'automatisation des procédés. Cette approche se montre efficace sur une grande variété de substrats bien que la protection de fonctions protiques de type amine ou alcool soit nécessaire.¹⁰⁰ La synthèse de la $[\text{18F}]$ FDOPA peut aujourd'hui être réalisée à partir d'un ester boronique en utilisant cette approche (Schéma 21).¹⁰¹ La fluoration est réalisée en présence du complexe de cuivre chauffé à 110°C , puis le produit intermédiaire est déprotégé par action d'acide chlorhydrique concentré à 100°C afin de conduire au traceur désiré avec un rendement de 38%.

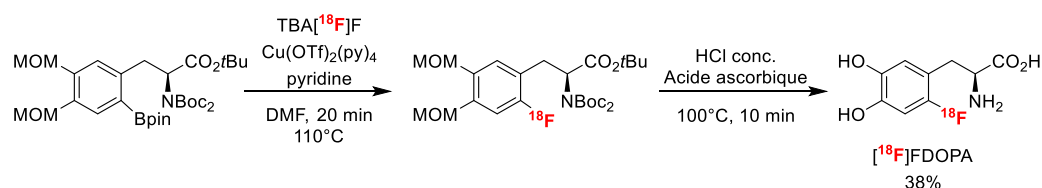


Schéma 21: Radiosynthèse de la $[\text{18F}]$ FDOPA en présence d'un complexe de cuivre

De même que les esters ou acides boroniques, les dérivés de trialkylétain sont susceptibles d'être utilisés pour une fluoration aromatique de type Chan-Lam en présence des mêmes catalyseurs de cuivre (II).¹⁰² Ces dérivés ont été utilisés dans des conditions similaires de radiofluoration en présence de fluor-18.¹⁰³ Cette technique a été utilisée pour le marquage du

[¹⁸F]MPPF, un ligand des récepteurs sérotoninergiques. Le précurseur stannylé est radiofluoré en présence de triflate de cuivre et de pyridine à 100°C durant 15 minutes, permettant l'obtention du composé [¹⁸F]MPPF avec un rendement de 13% corrigé de la décroissance (Schéma 22).

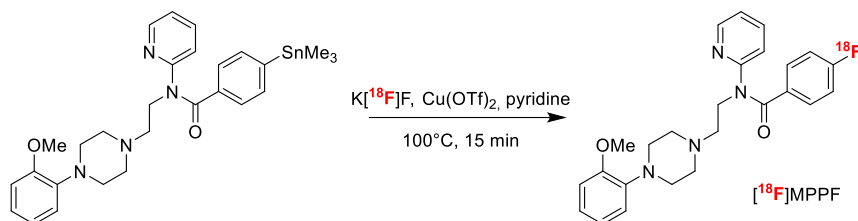


Schéma 22: Radiosynthèse du [¹⁸F]MPPF catalysée au cuivre à partir d'un précurseur stannylé

En conclusion, il existe de nombreuses méthodes de radiofluoration pour accéder à un éventail relativement élargi de motifs moléculaires et donc de traceurs disponibles pour l'imagerie TEP. Cependant, il reste encore bien des défis à relever pour améliorer les procédés de marquage ou accéder à de nouvelles molécules fluorées. Aujourd'hui, parmi les méthodes de marquage au fluor-18 décrites, toutes ne sont pas très répandues du fait de mises en pratique complexes. C'est pourquoi, en plus des S_N2 aliphatiques, la grande majorité des réactions de radiofluoration sont aujourd'hui centrées sur des S_NAr de noyaux aromatiques appauvris en électrons, sur l'utilisation de la catalyse au cuivre (II) ou sur l'utilisation d'iode hypervalent.

La conception d'un radiotraceur demeure toujours relativement complexe étant données les nombreuses limitations que comportent chaque méthode de marquage, bien que les méthodes actuelles soient en constante amélioration et permettront certainement de fournir de nouveaux outils synthétiques au service de la diversité pour l'imagerie TEP.

III.1.

III. Objectifs des travaux de thèse

Cibles originales pour le développement de nouveaux outils pour l'imagerie TEP en oncologie

Comme expliqué précédemment, le cancer est une maladie complexe qui présente des hétérogénéités au niveau cellulaire difficiles à détecter. Des mutations génétiques sont souvent à l'origine de dérégulations de protéines, conduisant à la prolifération et la migration

incontrôlée des cellules tumorales et à l'expansion du cancer. Dans ce contexte, la tomographie par émission de positons serait un outil diagnostique pertinent pour la détection de ces biomarqueurs dérégulés, permettant ainsi d'améliorer la compréhension de mécanismes physiopathologiques mais aussi de soutenir le développement pharmaceutique de nouveaux traitements en oncologie.

Dans ce contexte, la protéine gardienne du génome p53 est mutée et surexprimée dans un grand nombre de cancers et favorise la prolifération ainsi que la survie des cellules tumorales. De plus, le niveau d'expression cytoplasmique différent entre la protéine mutée et la protéine native en font un biomarqueur potentiel pour l'imagerie TEP qui apporterait des informations quant à l'agressivité des tumeurs qui est directement liée à l'expression de p53 mutée.

Par ailleurs, la protéine Focal Adhesion Kinase (FAK), également surexprimée dans un grand nombre de cancers tels que les cancers du sein, du colon ou encore de la prostate, participe également au développement du cancer. Cette protéine joue un rôle clé dans la migration, l'invasion et la survie cellulaire. La surexpression de cette protéine en fait donc également un marqueur de choix pour l'imagerie TEP.

Enfin, la sphingosine kinase 1 (SK1) joue un rôle prépondérant dans la prolifération, la migration, l'angiogenèse et la survie cellulaire. Elle se trouve être surexprimée dans de nombreux cancers tels que les cancers du poumon ou du foie par exemple. La surexpression de SK1 entraîne également une résistance accrue aux traitements de chimiothérapie. Ainsi, pouvoir détecter sa présence à un stade précoce grâce à l'imagerie TEP améliorerait considérablement le diagnostic et permettrait d'orienter les traitements dans une démarche de médecine personnalisée.

Ces trois cibles ont donc été choisies comme des biomarqueurs dérégulés dans le contexte du cancer. L'enjeu de ce travail de thèse consiste au développement de nouveaux radioligands spécifiques de ces cibles pour l'imagerie TEP. En effet, disposer de radiotraceurs de haute affinité et spécificité pour ces cibles protéiques permettra de quantifier de manière peu invasive la surexpression de ces protéines pour catégoriser les tumeurs, suivre leur évolution voire évaluer l'efficacité d'un traitement ciblé. Toute cette démarche s'inscrit dans une logique de personnalisation des traitements pour le patient au travers d'une médecine de pointe.

Choix pertinent d'un traceur pour l'imagerie TEP

Ce travail de thèse consiste donc à développer de nouveaux traceurs, marqués au carbone-11 ou au fluor-18, pour l'imagerie TEP des protéines p53, FAK et SK1. Pour cela, après une étude bibliographique, des pharmacophores présentant une bonne affinité pour ces cibles énoncées ^{III.2.} vont être sélectionnés. Plusieurs paramètres sont à considérer pour concevoir le radiotracteur optimal. Un compromis est souvent nécessaire entre une bonne affinité, une bonne sélectivité pour la cible et des propriétés pharmacologiques prometteuses (biodistribution, métabolisme, passage de membranes, etc.). Par ailleurs, pour que la molécule d'intérêt puisse devenir un traceur, elle doit comporter dans sa structure un atome de carbone ou de fluor dans une position où l'insertion du radio-isotope est réalisable grâce aux techniques de marquage existantes. Si tel est le cas, on parle alors de marquage isotopique. Cette approche est plus souvent compatible avec un marquage au carbone-11 du fait de l'omniprésence du carbone dans les molécules organiques et de l'importance des fonctions *O*-méthyle, *N*-méthyle ou *S*-méthyle dans les composés d'intérêt. De nombreuses molécules d'intérêt possèdent aussi un atome de fluor et permettraient ainsi théoriquement de réaliser un marquage isotopique avec du fluor-18. Cependant, la position de celui-ci n'est pas souvent compatible avec les techniques de radiofluoration disponibles. Pour contourner ce problème, une autre possibilité est de procéder à de la pharmacomodulation. La structure possédant une bonne affinité pour la cible sélectionnée est légèrement modifiée dans le but d'y incorporer un atome de fluor dans une position de marquage réalisable avec du fluor-18, le plus souvent au bout d'une chaîne aliphatique ou sur un cycle aromatique appauvri en électrons. Il est important de souligner qu'une modification de structure entraîne des modifications de propriétés biologiques. Il convient alors de s'assurer que les analogues développés possèdent toujours des propriétés intéressantes vis-à-vis de leur cible biologique.

Pour développer ces traceurs, nous avons besoin de synthétiser deux molécules, qui constituent le couple « précurseur/référence » du radiotracteur. Le composé « référence » est une molécule possédant la même structure chimique que le traceur, mais avec des isotopes stables (carbone-12, fluor-19). Ce composé permet de mettre au point les opérations de purification par HPLC semi-préparative, et de contrôle-qualité du traceur synthétisé par HPLC analytique par comparaison des temps de rétention. Le précurseur de marquage sera quant à lui utilisé pour le radiomarquage : c'est une molécule qui possède une fonction chimique permettant l'introduction du radio-isotope pour former le traceur souhaité.

Molécules ciblées

Ce travail de thèse consistera donc à réaliser la synthèse de couples précurseur/référence basés sur des motifs moléculaires issus de la littérature et ciblant les protéines p53, FAK et SK1. Les références permettront la mise au point des étapes de purification et contrôle qualité alors que **III.3.** sur les précurseurs seront réalisés les radiomarquages pour lesquels les procédés seront optimisés et automatisés. Enfin, ces traceurs originaux seront évalués *in vitro* et *in vivo* dans le but de valider leur affinité pour leur cible et obtenir les premières images de la surexpression de ces protéines sur des modèles animaux (Figure 10).

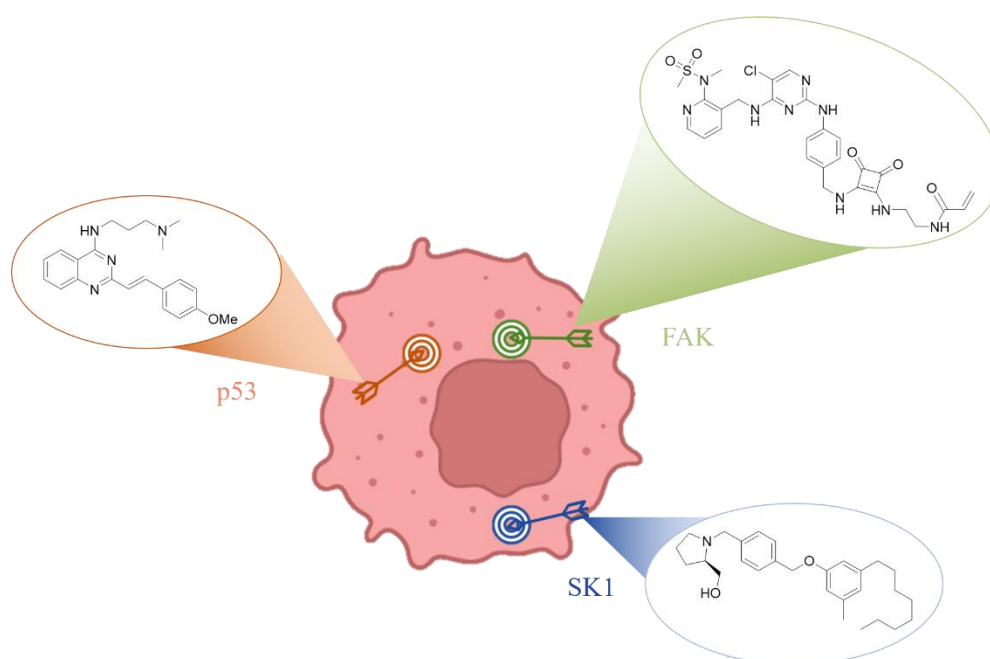


Figure 10: Récapitulatif des cibles protéiques évaluées avec les motifs moléculaires dont s'inspirent les développements de traceurs dans ce manuscrit

Pour la protéine p53, le composé **CP31398** a été sélectionné du fait de ses propriétés avérées de restauration des fonctions de p53 mutée.¹⁰⁴ Poussé jusqu'en étude clinique de phase I, ce composé possède un large spectre d'action concernant le nombre de mutations de p53 qu'il permet de traiter. Il s'agit d'une molécule de la famille des styrylquinazolines qui peut être marquée isotopiquement au carbone-11 sur sa fonction méthoxy. En parallèle, des analogues fluorés sont également envisagés pour pallier aux inconvénients du carbone-11. Dans la figure 11 sont présentés les traceurs envisagés, ainsi que les couples référence/précurseur correspondants. Si le marquage au carbone-11 peut être réalisé par méthylation sur un dérivé phénol, le composé **F-CP31398** imaginé posséderait quant à lui un fluor-18 en position 7 du noyau quinazoline, une modification chimique mineure qui devrait permettre de conserver les

propriétés biologiques du composé original du fait que le fluor est un bioisostère de l'hydrogène. Le marquage pourra alors être réalisé par fluoration aromatique assistée au cuivre(II) à partir d'un précurseur ester boronique ou trialkylstannane. En parallèle, le composé **PEG-CP31398** comportant un atome de fluor au bout d'une chaîne poly(éthylène)glycol (PEG) est imaginé. Si la modification chimique est plus importante par rapport au composé de la littérature, la méthode de marquage par S_N2 aliphatique à partir d'un précurseur tosylate offre davantage de garanties quant au succès du radiomarquage. On peut finalement noter la présence de noyaux aromatique sur sa structure, permettant la détection de ce type de composé lors des opérations de mise au point de contrôle qualité.

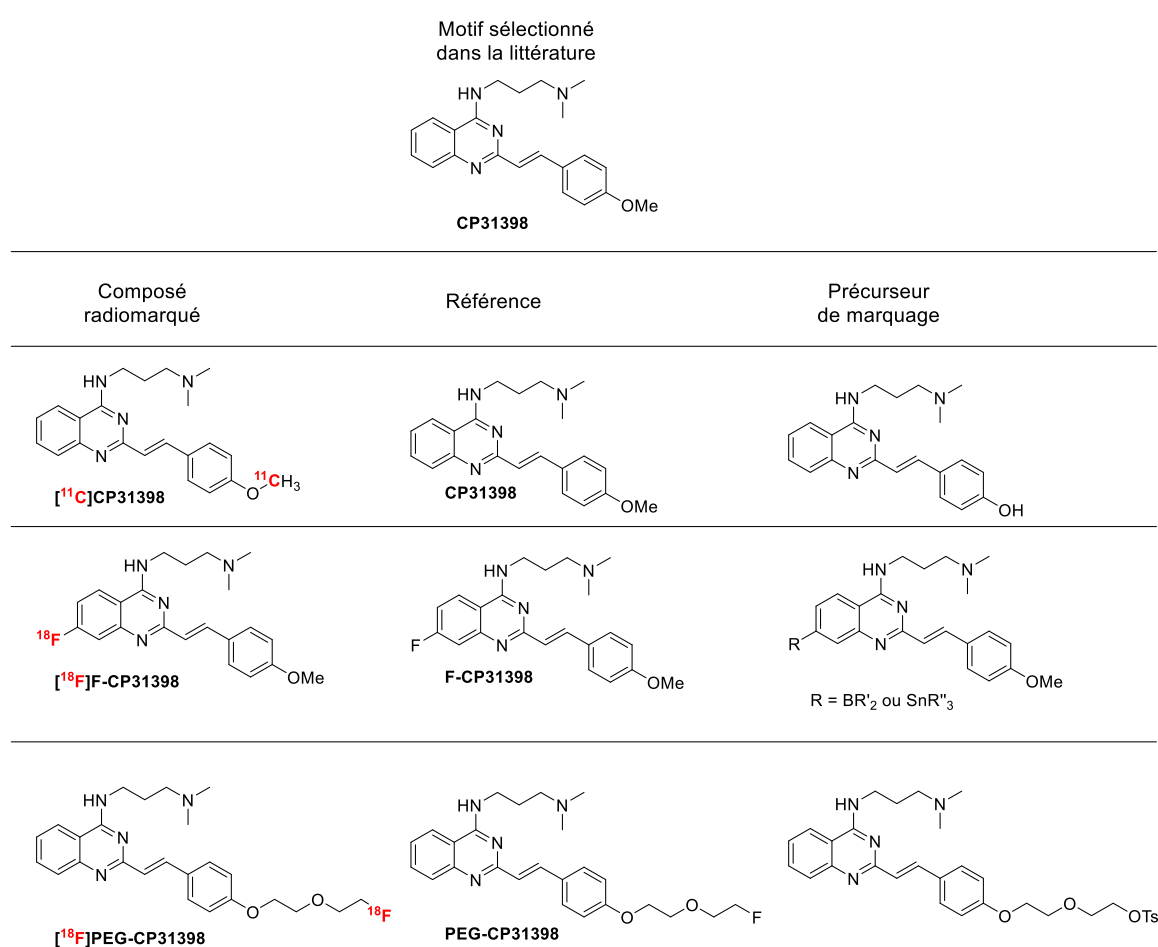


Figure 11: Traceurs envisagés pour cibler p53 ainsi que les couples précurseurs/références correspondants

En ce qui concerne la protéine FAK, le groupe de Li *et al.*¹⁰⁵ a identifié le composé **7f** comme inhibiteur covalent de FAK. Cette molécule possède une très bonne affinité ainsi qu'une bonne sélectivité pour FAK vis-à-vis d'autres kinases. Le caractère covalent du traceur permettrait d'accumuler ce dernier dans les cellules cancéreuses, améliorant de ce fait le rapport signal sur

bruit des images et la sensibilité de détection. Ainsi, un marquage isotopique au carbone-11 a été envisagé sur la fonction carbonyle du motif acrylate. En parallèle, différents analogues fluorés ont été imaginés ainsi que leurs précurseurs de marquage (Figure 12). Le composé **Py-FAK** possède un atome de fluor en position 2 du noyau pyridine, une position favorable au marquage par S_NAr à partir d'un précurseur possédant un groupement nitro. Le composé **FE-FAK** possède quant à lui une chaîne fluoroéthyle ajoutée sur la fonction sulfonamide du composé **7f** et pourrait être radiomarqué par S_N2 à partir d'un dérivé tosylate.

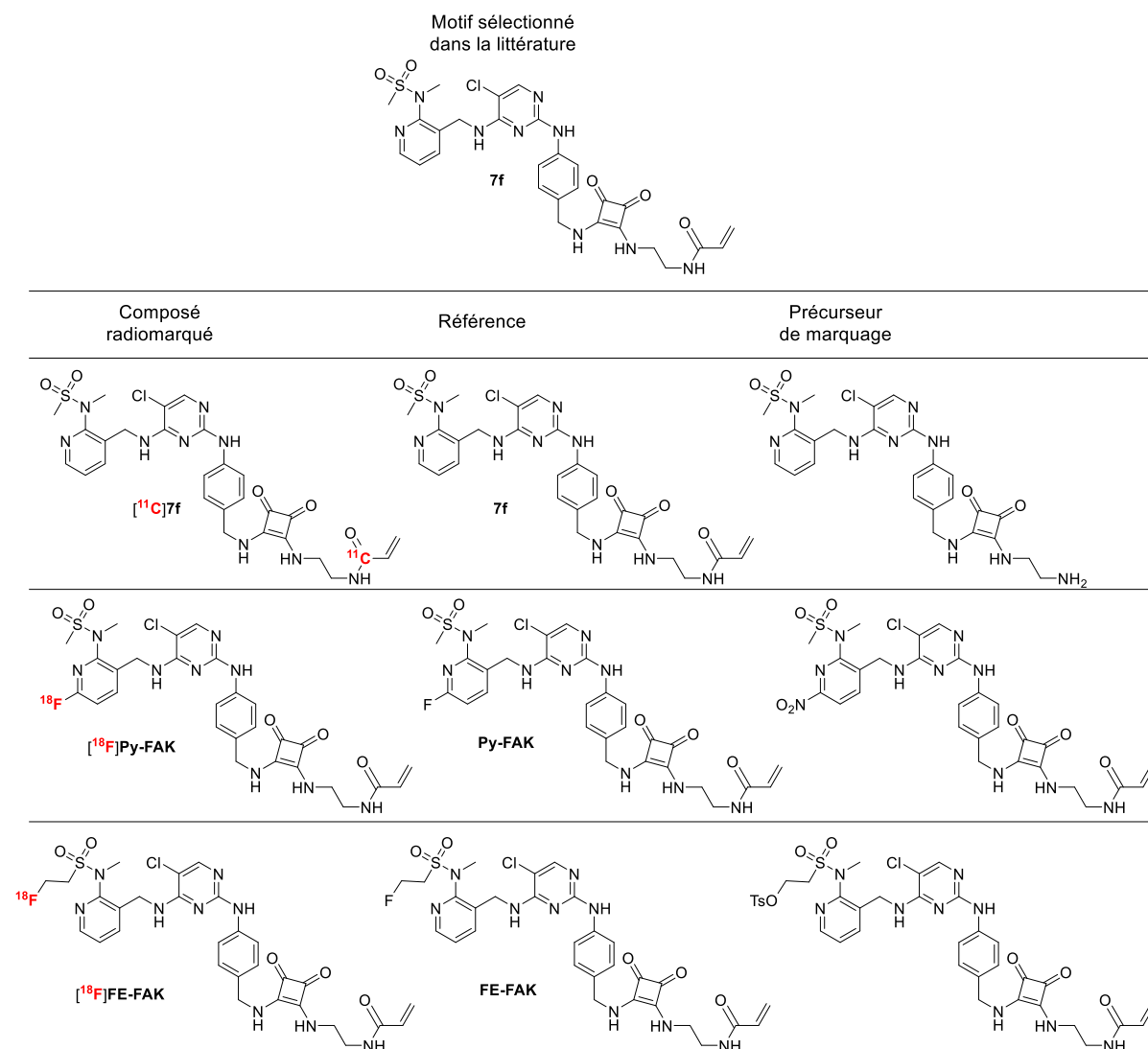


Figure 12: Traceurs envisagés pour cibler FAK ainsi que les couples précurseurs/références associés

Enfin, en ce qui concerne SK1, il existe de nombreux inhibiteurs développés dans la littérature et basés sur le modèle d'une tête polaire et d'une queue hydrophobe comme la molécule PF-543.^{106,107} Basé sur cette structure, le groupe de Kim *et al.* a développé un inhibiteur de SK1 possédant une affinité comparable à PF-543.¹⁰⁸ En utilisant la structure de ce dérivé, un analogue fluoré a été imaginé en introduisant un atome de fluor en bout de chaîne aliphatique

(Figure 13). Le fluor-18 peut donc être introduit par S_N2 aliphatique à partir d'un dérivé tosylate.

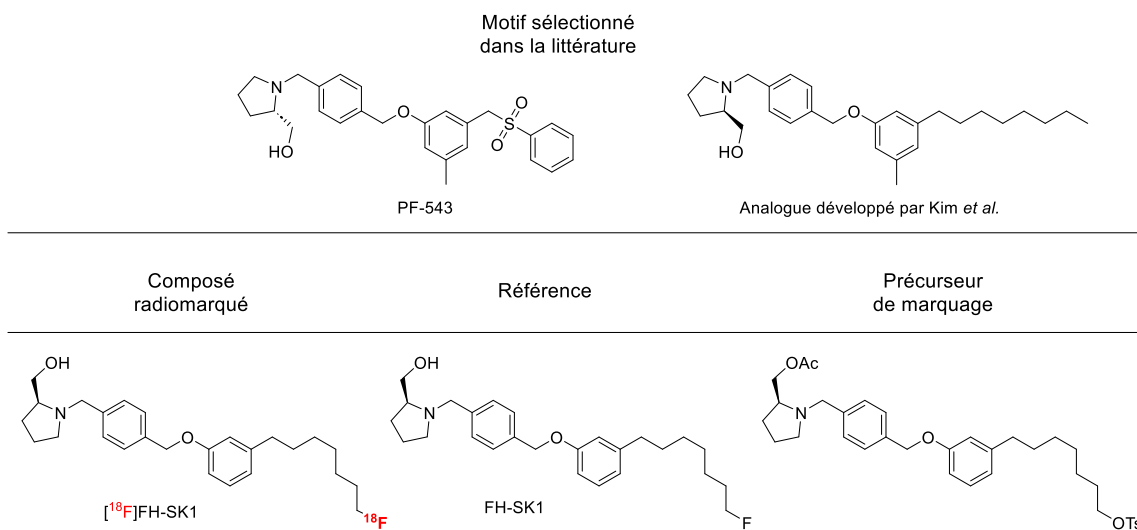


Figure 13 : Structure du traceur ciblant SK1 ainsi que le couple précurseur/référence correspondant

CHAPITRE 1 :
DÉVELOPPEMENT DE
RADIOTRACEURS POUR
L'IMAGERIE TEP DE LA PROTÉINE
p53

I. La protéine p53, un suppresseur de tumeur

Structure et fonction de p53

La protéine p53, « tumor protein 53 », aussi nommée protéine gardienne du génome, est une protéine ubiquitaire de 393 acides aminés, codée par le gène TP53 localisé sur le chromosome 17. Elle est exprimée dans le noyau des cellules et intervient comme un facteur de transcription en se liant à l'ADN de manière spécifique afin d'activer ou de réprimer la transcription de différents gènes. Cette fonction de stabilisation du brin d'ADN survient en cas de lésions ou de mutations de l'ADN.^{109,110}

La protéine p53 est composée de 5 domaines principaux¹¹¹ (Figure I.1):

- le domaine de transactivation (acides aminés 1-40) en N-terminal, qui est responsable de l'activation transcriptionnelle et qui intervient également dans l'interaction avec la protéine murine double minute 2 (MDM2), une ubiquitine ligase qui régule négativement p53
- le domaine riche en prolines (acides aminés 61-94), contrôlant la stabilisation et l'activation de p53
- le domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain, DBD), (acides aminés 100-300), participant à la fixation sur des séquences spécifiques d'ADN.
- le domaine de tétramérisation (acides aminés 324-355) et le domaine C-terminal (acides aminés 360-393), participant à la fixation à l'ADN via le DBD.
- Le domaine C-terminal participe aussi à la régulation négative de p53.¹¹²

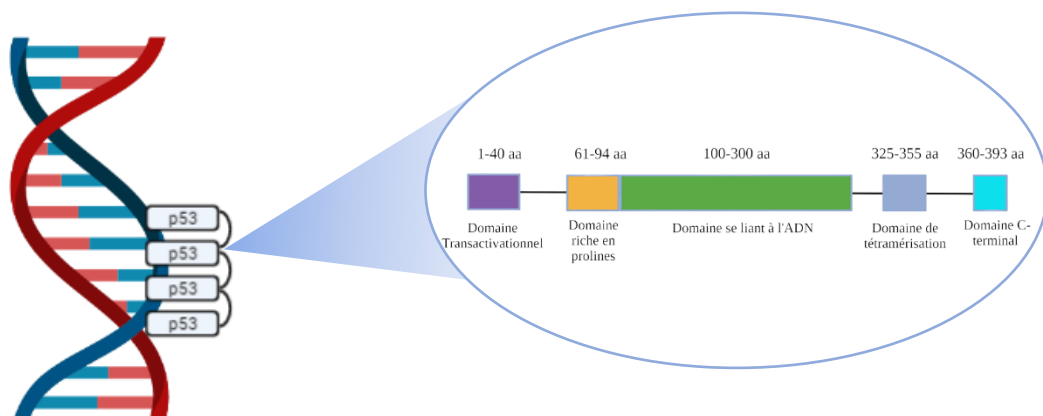


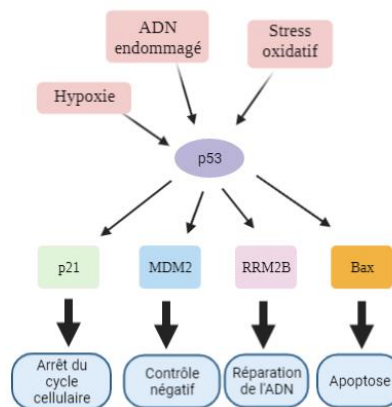
Figure I.1: Structure de la protéine p53 divisée en 5 domaines principaux

La protéine p53 joue un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité génomique en régulant des voies de signalisation conduisant soit à l'arrêt du cycle cellulaire pour permettre la réparation des dommages causés à l'ADN, soit à l'apoptose, ou à la sénescence cellulaire.^{113,114} C'est pourquoi la protéine p53 est qualifiée de « suppresseur de tumeur » : son action de mort programmée des cellules à l'ADN muté est déterminante pour empêcher le développement tumoral.¹¹⁵

Mécanismes d'action de p53

La protéine p53 agit comme un facteur de transcription, se liant à différents promoteurs de gènes cibles tels que CDKN1A (qui code pour p21), MDM2, RRM2B ou BAX entre autres (Schéma I.1).^{116,117} Dans une cellule saine sans dommage à l'ADN, p53 est maintenue inactive et à un niveau d'expression très faible grâce à sa liaison avec MDM2.¹¹⁸ En revanche, en réponse à un dommage à l'ADN ou à un stress, p53 va être activée par rupture de sa liaison avec MDM2, permettant son accumulation dans le noyau et initiant ses fonctions de transcription de gènes.¹¹⁹ Elle va ainsi activer ou réprimer leur niveau d'expression pour engendrer l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose ou des mécanismes de réparations de l'ADN.

120



I.3. Schéma I.1 : Fonctions cellulaires de p53 activées en réponse à un stress ou une mutation de l'ADN

Mutations de p53 et cancer

Dans plus de 50% des cancers, la protéine p53 présente des mutations se situant dans son domaine de liaison à l'ADN,¹²¹ engendrant alors l'inaptitude de la protéine à réaliser ses

fonctions de réparation ou de protection.^{122,123,124} De plus, les mutations de p53 peuvent engendrer une oligomérisation de la protéine native inhibant ses fonctions de suppression de tumeur. La protéine mutée s'accumule alors dans le cytoplasme des cellules tumorales où elle n'est plus dégradée par la machinerie cellulaire.^{125,126} Les voies de signalisation impliquant p53 sont alors altérées, et la mutation de cette protéine est donc associée à un facteur de mauvais pronostic.¹²⁷ De plus, les tumeurs présentant la protéine mutée possèdent des capacités de chimiorésistance accrues : elles sont capables d'activer d'autres gènes cibles de façon inappropriée. En effet, des promoteurs cellulaires non régulés initialement par la protéine p53 native comme par exemple les facteurs de croissance épithéliales (EGF) et vasculaires (VEGF) sont activés et favorisent la progression tumorale.¹²⁸⁻¹³²

Diagnosics et traitements visant p53

1.4. Les mutations de la protéine p53 sont donc liées à la progression tumorale et au mauvais pronostic de certains cancers (prostate, colon, sein), ainsi qu'au caractère chimio- ou radio-résistant de certaines tumeurs. Son statut au centre de nombreuses voies de signalisation cellulaire et de mécanismes de suppression tumorale en fait donc une cible potentielle pour l'exploration de nouvelles voies thérapeutiques contre le cancer.

La détection du caractère mutant de p53 s'effectue par biopsie.¹³³ Une partie de la tumeur est prélevée chez le patient, puis l'ADN extrait est amplifié par PCR « polymerase chain reaction » (PCR) pour aboutir à la détection de p53 mutée par électrophorèse. Par ailleurs, une analyse par immunohistochimie est également possible afin de déceler la présence de mutation de p53 en utilisant des anticorps anti-p53.¹³⁴

Différentes approches thérapeutiques existent contre les mutations oncogéniques de p53. La thérapie génique permet la réintroduction ou l'expression de la protéine exogène dans les cellules tumorales afin d'initier une réponse immunitaire.¹³⁵ La restauration de la conformation native de p53 à l'aide de fragments de séquence de cette protéine est également développée.¹²⁵ D'autres approches utilisant de petites molécules dérivées du noyau imidazole appelées Nutlins ont été développées par le groupe de Vassilev¹³⁶ afin de cibler l'interaction MDM2-p53, détournant ainsi p53 de sa dégradation et restaurant ses fonctions de contrôle du cycle cellulaire. Par ailleurs, il a été montré que p53 pourrait constituer une cible antigénique du fait de sa

surexpression dans les cellules tumorales.

En effet, des fragments peptidiques de p53 sont utilisés afin d'induire une réponse immunitaire anti-p53 mutée.¹³⁷

Enfin, certaines molécules sont capables de restaurer la conformation native de p53 et donc ses fonctions de suppresseur de tumeurs. C'est le cas des composés PRIMA-1 (et son analogue PRIMA-1^{MET}) ou CP31398 (Figure I.2).^{138,139}

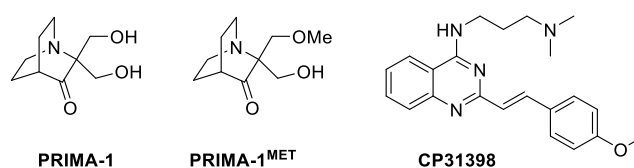


Figure I.2: Structure des composés PRIMA-1, PRIMA-1^{MET} et CP31398

Leurs mécanismes d'action ne sont pas totalement élucidés, mais ces composés auraient la capacité de se lier à des résidus d'acides aminés du DBD de p53, pouvant restaurer les fonctions cellulaires de la protéine.^{140,141} Il a été montré que les composés PRIMA-1 et PRIMA-1^{MET} possèdent des effets cytotoxiques et induiraient l'apoptose sur des lignées cellulaires de patients atteints de leucémie myéloïde aigüe possédant une mutation de la protéine p53.¹⁴² De plus, des tests précliniques sur modèles murins ont révélé une activité anti-tumorale sans effet toxique apparent.¹⁴³ Des essais cliniques de phase 1 ont été menés sur des patients atteints de cancer de la prostate, et l'étude a montré des résultats satisfaisants quant à la toxicité tolérable du composé ainsi qu'à son activité anti-tumorale. De plus, PRIMA-1^{MET} possède un profil pharmacocinétique compatible avec une utilisation en clinique.¹⁴⁴ Le composé CP31398, quant à lui, a démontré des effets de restauration de p53 native ainsi que de ses fonctions de suppression tumorale sur des cellules de cancers de la peau.¹⁴⁵

I.5.

Imagerie de p53

La biopsie est une technique invasive, douloureuse pour les patients et qui ne permet pas de rendre compte de l'hétérogénéité des tumeurs ni de la présence de métastases. Afin de réaliser le diagnostic des mutations de p53, les recherches se portent à l'heure actuelle vers le développement de méthodes d'imagerie peu invasives comme l'imagerie optique. Des

méthodes spectroscopiques ont été développées en utilisant notamment des nanoparticules d'or possédant des fragments d'ADN reconnus spécifiquement par p53 native.¹⁴⁶ L'interaction p53-MDM2 a par ailleurs été étudiée par imagerie de bioluminescence ou grâce au développement de sondes fluorescentes.^{147,148} Plus récemment, le groupe de Zhou *et al.*¹⁴⁹ a développé une nanosonde capable de détecter l'expression de p53 mutée dans les cellules.

Bien que l'imagerie TEP ait été utilisée pour visualiser l'expression des gènes régulés par p53 avec le composé [¹²⁴I]-FIAU (2'-fluoro-2'-deoxy-1-beta-d-arabinofuranosyl-5-[¹²⁴I]iodouracil) marqué à l'iode-124,¹⁵⁰ il n'existe pas à ce jour de traceur radioactif permettant de cibler directement la surexpression de p53 mutée.

II. Imagerie TEP de p53 : une nouvelle technique pour le suivi thérapeutique et le développement de médicaments

II.1. Avantages de l'imagerie TEP de p53

La TEP est une technique d'imagerie moléculaire de haute sensibilité et quantitative qui permettrait une réelle avancée par rapport aux techniques actuelles de détection de p53 très invasives comme la biopsie ou de faible pénétration tissulaire comme l'imagerie optique. De plus, la protéine p53 mutée est surexprimée dans un grand nombre de cancers, faisant d'elle un biomarqueur de choix pour l'imagerie TEP. En effet, les différences d'expression de p53 entre l'état natif et l'état muté pourraient être détectées grâce à la grande sensibilité de la technique. De plus, la présence de la protéine p53 mutée dans le cytoplasme cellulaire (alors que la protéine native est confinée au noyau) la rend plus accessible pour un ciblage par un radiotraceur. L'imagerie TEP permettrait alors un suivi thérapeutique de la progression tumorale par la détection quantitative de la présence de p53 mutée dans le cytoplasme.¹²⁵ De plus, le développement de radiotraceurs spécifiques de la protéine p53 mutée ouvre la voie de compagnons diagnostiques pour accompagner le développement de thérapies ciblées.¹⁵¹

CP31398 : un candidat radiotraceur de p53

La molécule **CP31398** (Figure I.3a), de la famille des styrylquinazolines, est une molécule qui possède la faculté de stabiliser la protéine mutée, permettant de restaurer ses fonctions par

modification de la conformation du DBD de p53 mutée.¹³⁹ Une évaluation biologique *in vitro* a montré que le pharmacophore **CP31398** engendrait le phénomène d'apoptose de 6 lignées cellulaires cancéreuses sur les 9 testées.¹⁵² De plus, il rétablirait ses fonctions de suppression tumorale *in vivo*. En effet, sur des modèles murins de mélanomes xéno greffés, le groupe de Foster *et al.* a noté une réduction de la taille de la tumeur de 50% lorsque les animaux étaient traités avec le composé **CP31398** (Figure I.3b, ● : souris traitées).¹⁵³ Cependant, le groupe de Johnson *et al.* a montré qu'une importante toxicité du composé **CP31398** à haute dose, était un frein pour son développement clinique.¹⁵⁴ Néanmoins, cette toxicité n'est pas incompatible avec une utilisation en tant que traceur pour l'imagerie TEP étant données les faibles doses (quelques µg) injectées chez le patient.

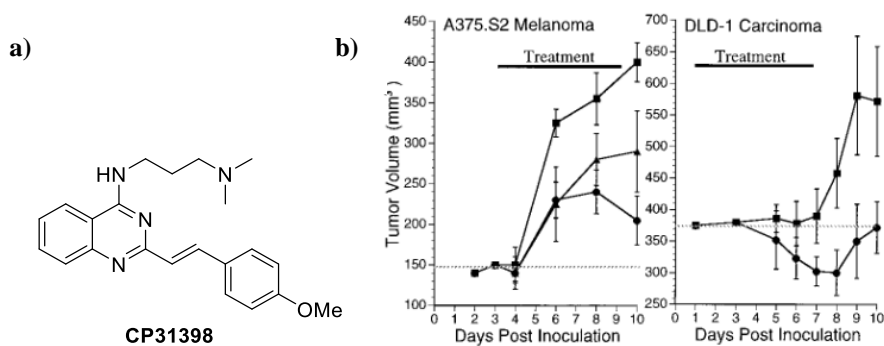


Figure I.3: a) Structure du composé **CP31398** b) Graphiques démontrant la réduction du volume tumoral après traitement avec le **CP31398** : ■ souris contrôles injectées avec du sérum physiologique, souris traitées avec le composé **CP31398** deux fois par jour (●) ou une fois par jour (▲)¹⁵³

Ce pharmacophore a donc été choisi comme candidat radiotraceur pour cibler les dérégulations de p53 en imagerie TEP. En effet, le composé **CP31398** possède une fonction méthoxy intéressante au niveau de laquelle le marquage isotopique au carbone-11 par méthylation est possible. Le marquage isotopique au carbone-11 présente l'avantage de conserver la structure du composé **CP31398** à l'identique et donc de préserver ses propriétés biologiques, notamment vis-à-vis de p53. Néanmoins, à cause de sa demi-vie courte de 20,4 minutes, le carbone-11 reste un radioisotope limité à des activités de recherche et disponible dans peu de centre TEP. Ainsi, le développement de radiotraceurs marqués au fluor-18, analogues du composé **CP31398**, doit être envisagé dans l'optique de rendre accessible l'imagerie TEP de la protéine p53 à un grand nombre d'hôpitaux et centres de recherche.

Objectifs des travaux

La première molécule envisagée est donc le **CP31398** lui-même qui peut être marqué isotopiquement au carbone-11 par méthylation d'un précurseur de marquage phénol (Figure I.4a). Deux analogues fluorés marqués au fluor-18 du composé **CP31398** sont également envisagés. Le premier composé nommé **F-CP31398** possède une structure très similaire au composé **CP31398** avec un atome de fluor sur la position 7 du motif quinazoline. Le fluor étant un bioisostère de l'hydrogène, des propriétés similaires à celles du **CP31398** sont attendues bien qu'une modification de la distribution électronique soit engendrée. Cependant, cette approche est risquée d'un point de vue radiomarquage au fluor-18. En effet, le motif quinazoline est riche en électrons et l'introduction de l'ion fluorure $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ par substitution nucléophile aromatique n'est pas envisageable. A la place, un couplage de type Chan-Lam entre un ester boronique ou un dérivé stannylé et l'ion $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ peut être envisagé (Figure I.4b). Enfin, un deuxième analogue du composé **CP31398** nommé **PEG-CP31398** et possédant une chaîne de type polyéthylène glycol (PEG) est envisagé (Figure I.4b). Bien que les modifications de structures soient plus importantes comparé au composé **F-CP31398**, le radiomarquage par substitution nucléophile aliphatique sur un groupement partant de type tosylate est largement décrit dans la littérature avec d'excellents rendements.^{155,156} De plus, la chaîne PEG représente un bon compromis entre lipophilie et solubilité en milieu aqueux *in vivo*, tout en possédant une bonne stabilité métabolique.^{157,158}

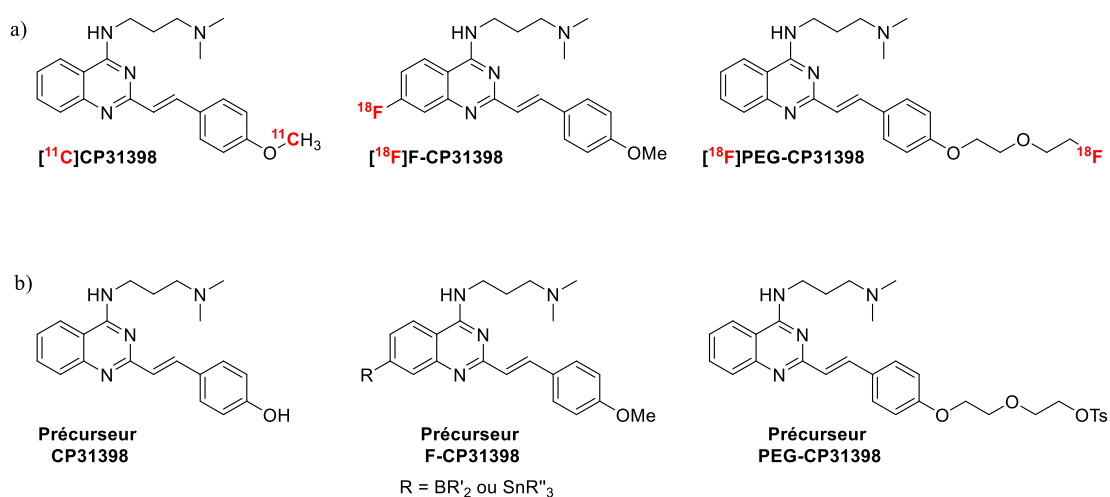


Figure I.4: Objectifs des travaux: a) Radiotraceurs dérivés du composé **CP31398** envisagés b) précurseurs de marquage associés

III. Synthèse des composés CP31398, F-CP31398 et PEG-CP31398 et de leurs précurseurs de marquage

Synthèse du composé CP31398 et de son précurseur de marquage

Formation de l'intermédiaire styrylquinazolin-4(3H)-one

Afin d'aboutir au composé **CP31398** et à son précurseur de marquage par une unique voie de synthèse, une rétrosynthèse dans laquelle le composé **CP31398** peut être obtenu par

III.1.1.

méthylation du dérivé phénol correspondant est proposée. (Schéma I.2). Le composé phénol sera par ailleurs le précurseur de marquage pour la méthylation au carbone-11. Il peut lui-même être synthétisé à partir de la 2-méthylquinazolin-4(3H)-one commerciale par condensations successives du motif phénol puis de la chaîne diaminopropyle en s'inspirant de la synthèse du composé **CP31398** décrite dans la littérature par Mularski *et al.* en 2019.¹⁵⁹

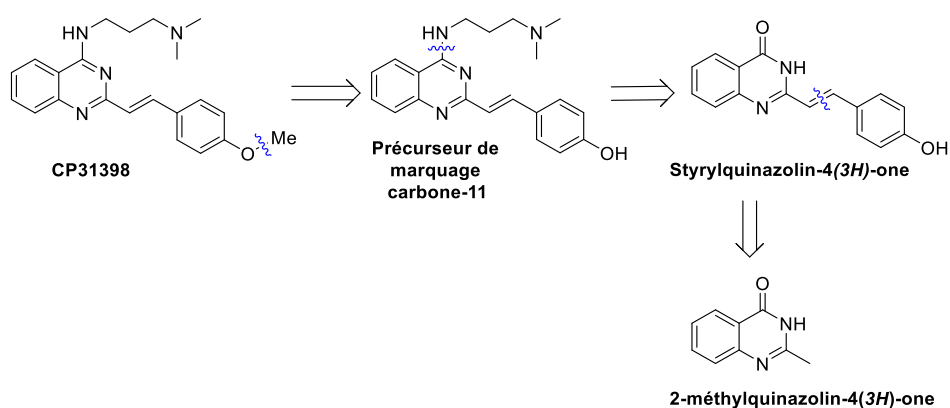


Schéma I.2: Analyse rétrosynthétique menant au composé **CP31398** et à son précurseur de marquage

En s'inspirant des travaux de Mularski *et al.*,¹⁵⁹ une réaction de condensation a été réalisée entre la 2-méthylquinazolin-4(3H)-one et le 4-hydroxybenzaldéhyde en présence d'acétate de potassium dans l'acide acétique à 110°C pour conduire au composé **1** avec un rendement de 80% (Schéma I.3). Afin de réaliser l'activation du motif quinazoline en vue de l'alkylation avec la chaîne diaminopropyle, la fonction phénol a dans un premier temps été protégée par un éther silylé pour conduire au composé **2** avec un rendement de 97%. Le motif quinazolin-4(3H)-one est ensuite fonctionnalisé sous la forme d'un tosylate en s'inspirant des travaux de Mularski *et al.*¹⁵⁹ pour conduire au composé **3** avec un rendement de 77%. Une substitution nucléophile aromatique de la *N*¹,*N*¹-diméthylpropane-1,3-diamine sur le composé activé **3** suivie d'une déprotection de l'éther de silyle en conditions acides mènent au composé **4** avec un rendement de 70% sur 2 étapes. Cependant, les analyses RMN et LC-MS ont montré une pureté du

composé **4** non satisfaisante avec la présence de 10% de composé **1** malgré plusieurs étapes de purifications chromatographiques en phase normale et en phase inverse. En tant que précurseur de marquage, ce composé nécessite une pureté >95% ; ainsi, d'autres conditions de synthèse ont alors été envisagées.

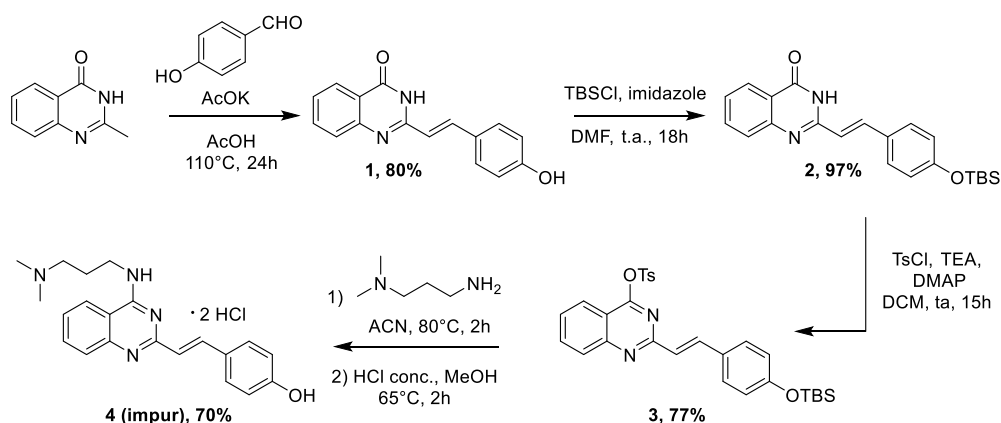


Schéma I.3: Synthèse du composé **4** en passant par l'intermédiaire styrylquinazolin-4(3H)-one

Tout en conservant une stratégie de synthèse similaire, l'activation du noyau quinazoline peut être réalisée par chloration de composé **1** en présence de chlorure de thionyle en s'inspirant de la littérature (Schéma I.4).¹⁶⁰ Cette approche ne nécessite pas la protection de la fonction phénol et conduit à un intermédiaire chloré qui n'a pas été isolé. Sur ce dernier est effectuée une réaction de substitution nucléophile aromatique avec la *N,N'*-diméthylpropane-1,3-diamine dans le dioxane à reflux, suivie d'un traitement acide afin d'obtenir le composé **4** sous forme de chlorhydrate avec un rendement de 48%. Dans ces conditions également, les analyses LC-MS et RMN ont montré que le composé **4** est obtenu en mélange inséparable avec le composé **1** de départ.

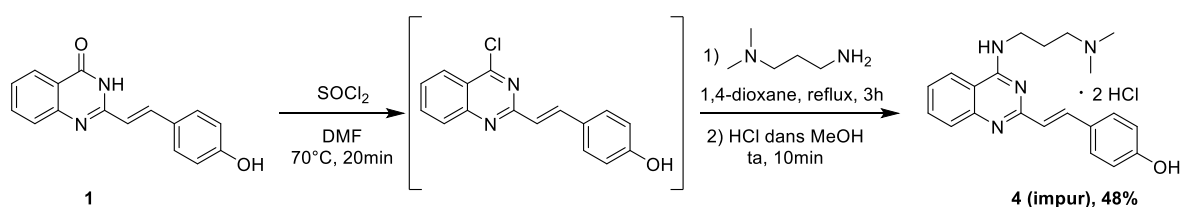


Schéma I.4: Synthèse du composé **4** par activation au chlorure de thionyle

Pour pallier à ce problème de pureté, une autre approche a été explorée pour introduire la chaîne diaminopropyle par couplage en s'inspirant de la méthode décrite par Wan *et al.*¹⁶¹. La réaction entre le composé **1** et la *N,N'*-diméthylpropane-1,3-diamine en présence

d'hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yloxytris(diméthylamino)phosphonium (BOP) comme agent de couplage et de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ene (DBU) dans l'ACN à température ambiante a mené à la formation du composé **4** souhaité (41%), mais également à la formation du composé **5** majoritaire (59%) résultant d'une condensation du composé **1** sur lui-même via la fonction phénol (Schéma I.5). La protection de la fonction hydroxyle est donc indispensable pour éviter une réaction de couplage du composé **1** sur lui-même.

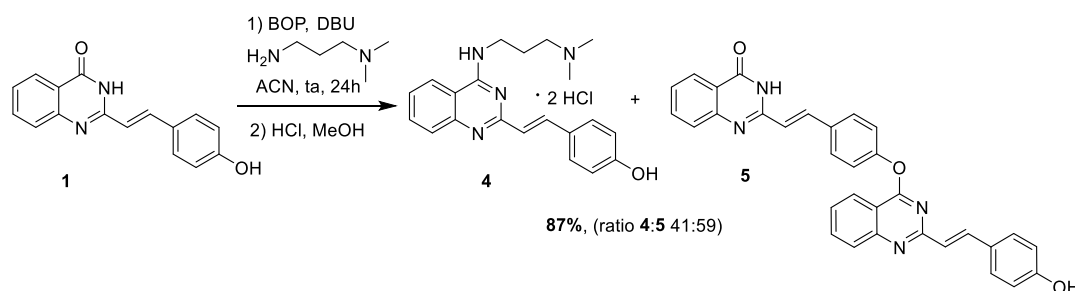


Schéma I.5: Synthèse du composé **4** à partir du composé **1** via une réaction de couplage

III.1.2. Formation de l'intermédiaire quinazolin-4-yl

Compte-tenu des difficultés rencontrées dans l'approche précédente, notamment avec la fonction phénol, une nouvelle approche a été envisagée dans laquelle le fragment phénol est introduit après la chaîne diaminopropyle, toujours à partir de la 2-méthylquinazolin-4(3*H*)-one commerciale (Schéma I.6).

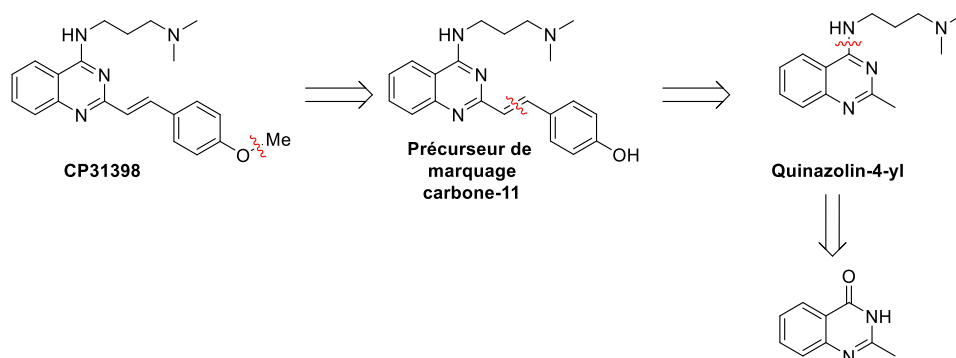


Schéma I.6: Approche rétrosynthétique par formation d'un intermédiaire quiazolin-4-yl

En s'inspirant de la méthode de Wan *et al.*¹⁶¹, la condensation de la *N*¹,*N*¹-diméthylpropane-1,3-diamine sur la 2-méthylquinazolin-4(3*H*)-one par couplage a permis d'aboutir au composé **6** avec un rendement de 70% (Schéma I.7). Les différentes conditions testées pour réaliser la

condensation du 4-hydroxybenzaldéhyde sur le composé **6** sont résumées dans le Tableau I.1. Une première condensation a été réalisée en présence d'acétate de potassium dans l'acide acétique à 100°C, conditions qui ont permis l'obtention du composé **1** dans la première approche. (Tableau I.1, entrée 1). Dans ce cas, seule une très faible quantité du produit désiré **4** est détectée par LC-MS avec 98% du produit de départ **6** restant. L'ajout d'iodure de tétrabutylammonium comme catalyseur de la réaction n'a pas non plus permis la formation du produit désiré (Tableau I.1, entrée 2). Enfin, l'utilisation d'une base plus forte comme l'hydroxyde de potassium a entraîné une dégradation partielle du composé **6** (Tableau I.1, entrée 3).

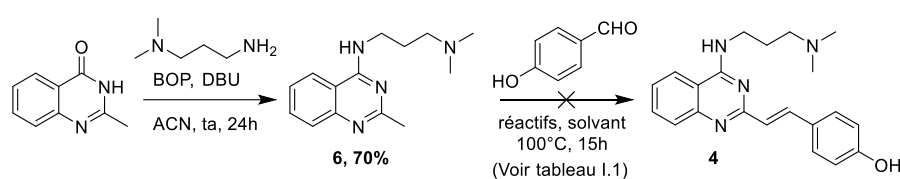


Schéma I.7: Essai de synthèse du composé **4** par un intermédiaire quinazolin-4-yl

Entrée	Catalyseur	Base	Solvant	6	4
1	-	AcOK	AcOH	98%	<2%
2	TBAI	AcOK	AcOH	100%	0%
3	-	KOH	H ₂ O	95%	0%

Tableau I.1: Conditions testées pour la condensation entre le 4-hydroxybenzaldéhyde et le composé **6**

La stratégie employée ici n'a pas permis d'obtenir le composé **4** souhaité. En effet, l'étape de condensation du benzaldéhyde sur le composé **6** possédant déjà la chaîne N^1,N^1 -diméthylpropane-1,3-diamine ne fonctionne pas malgré les conditions testées. Cela peut être dû à une densité électronique trop importante du composé **6** ne permettant pas de réaliser la réaction de condensation.

III.1.3.

Synthèse du précurseur de marquage par déméthylation de CP31398

Compte-tenu des résultats négatifs des différentes approches explorées précédemment et de l'importance de la protection de la fonction phénol, une nouvelle stratégie a été envisagée (Schéma I.8). Dans cette approche, le précurseur phénol est obtenu par déméthylation du

composé **CP31398** lui-même synthétisé à partir de la 2-méthylquinazolin-4(3*H*)-one selon une méthode décrite dans la littérature.¹⁶²

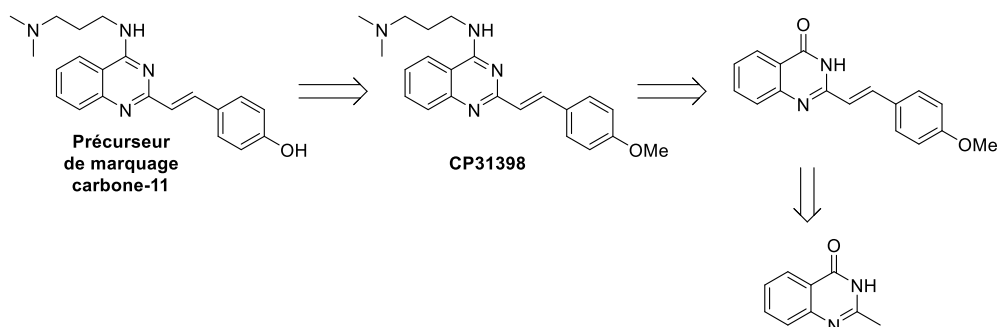


Schéma I.8: Approche par déméthylation du composé **CP31398**

Ainsi, une réaction de condensation entre la 2-méthylquinazolin-4(3*H*)-one et le *p*-anisaldéhyde (PAN) en présence d'acétate de potassium dans l'acide acétique à 110°C durant 30h a permis d'obtenir le composé **7** avec un rendement de 75% (Schéma I.9). Ensuite, une réaction de couplage avec la *N*¹,*N*¹-diméthylpropane-1,3-diamine en présence de BOP et de DBU dans l'ACN, suivie d'un traitement acide a permis d'obtenir le composé **CP31398** sous la forme d'un chlorhydrate avec un rendement de 92%. Le composé **CP31398** a été obtenu en 2 étapes avec un rendement global de 69%, supérieur à celui décrit par le groupe de Sutherland *et al.*¹⁶⁰ (44% en 2 étapes) passant par un intermédiaire chloré.

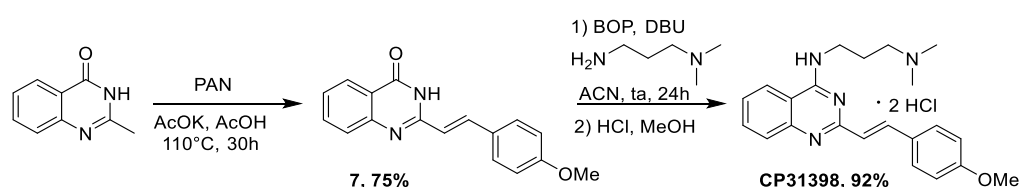


Schéma I.9: Synthèse du composé **CP31398**

Enfin, la réaction de déméthylation du composé **CP31398** inspirée des travaux de Newman *et al.*¹⁶² en présence de sulfure de sodium à haute température dans la *N*-méthyl-2-pyrrolidone a conduit au composé **4** avec un rendement de 75% (Schéma I.10). Le précurseur de marquage **4** a donc été obtenu avec un rendement de 52% sur 3 étapes et une pureté > 95%.

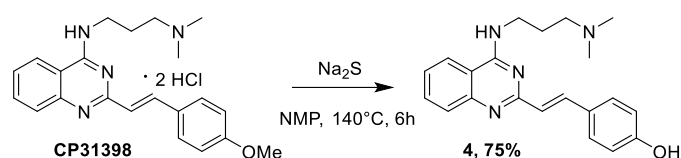


Schéma I.10: Synthèse du précurseur de marquage **4** par déméthylation du composé **CP31398**

Synthèse des analogues fluorés du composé CP31398

III.1.4.1. Synthèse du composé PEG-CP31398 et de son précurseur de marquage

La stratégie proposée pour obtenir le composé **PEG-CP31398** et son précurseur de marquage possédant une fonction tosylate passe par une alkylation de la fonction phénol du composé **4** précédemment synthétisé (Schéma I.11).

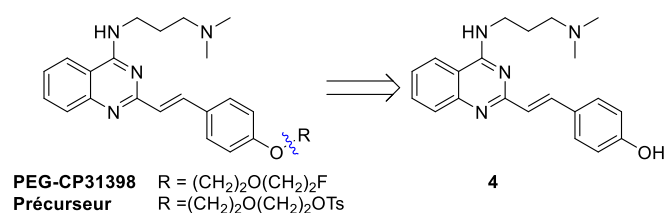


Schéma I.11: Analyse rétrosynthétique pour l'obtention du composé **PEG-CP31398** et de son précurseur de marquage au fluor-18

En utilisant le composé **4** préparé précédemment, le couple référence et précurseur du dérivé **PEG-CP31398** a été synthétisé par alkylation de la fonction phénol avec du diéthylène glycol di *p*-toluènesulfonate pour le précurseur de marquage ou par la molécule **8**¹⁶³ pour la référence fluorée, avec des rendements de 38% et 25% respectivement. Ces rendements moyens sont dus à de multiples étapes de purifications nécessaires à l'obtention des composés **PEG-CP31398** et **9** avec des puretés >95% (Schéma I.12). Ainsi, le composé **PEG-CP31398** et son précurseur de marquage **9** ont été obtenus avec des rendements globaux de 20% et 13% sur 4 étapes respectivement.

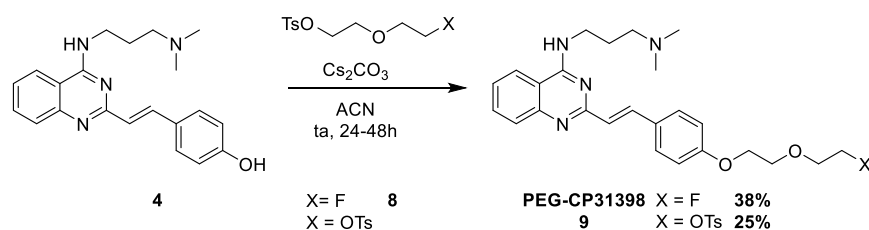


Schéma I.12: Synthèse du composé **PEG-CP31398** et de son précurseur de marquage **9** à partir du dérivé phénol **4**

III.1.4.2. Synthèse du composé F-CP31398 et de son précurseur de marquage

La synthèse du dérivé **F-CP31398** diffère des voies de synthèses utilisées pour les composés **PEG-CP31398** ou **CP31398**. En effet, pour obtenir le composé référence, l'atome de fluor doit être présent dès le début de la synthèse sur la position 7 de la 2-méthylquinazolin-4(3H)-one. Cependant, la stratégie générale reste similaire à celle employée auparavant. De même, le précurseur de marquage du composé **F-CP31398** peut être obtenu à partir de la 7-bromo-2-méthylquinazolin-4(3H)-one (Schéma I.13).

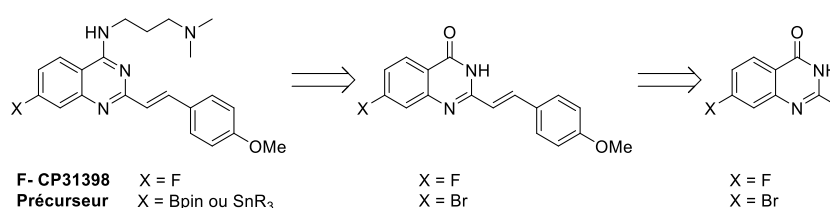


Schéma I.13: Analyse rétrosynthétique menant au composé **F-CP31398** et à ses précurseurs de marquage au fluor-18

La voie de synthèse employée pour aboutir au composé **10** s'inspire de la littérature (schéma I.14).^{164,165} Premièrement, l'acide 2-amino-4-fluorobenzoïque commercial est traité avec de l'anhydride acétique à 120°C durant 3h, puis avec de l'ammoniaque à 120°C pendant 4h pour permettre la cyclisation vers le pharmacophore 2-méthylquinazolinone **10** avec un rendement de 66% sur deux étapes. Comme précédemment, la condensation du composé **10** avec le PAN est réalisée en présence d'AcOK dans l'acide acétique à 110°C durant 24h pour obtenir le composé **11** avec un rendement de 55%. Ensuite, la *N,N'*-diméthylpropane-1,3-diamine est introduite *via* un couplage en présence de BOP et de DBU dans l'ACN à température ambiante pour obtenir le composé **F-CP31398** sous forme de chlorhydrate avec un rendement de 90%.

Au final, le composé **F-CP31398** est obtenu en 4 étapes avec un rendement global de 33%.

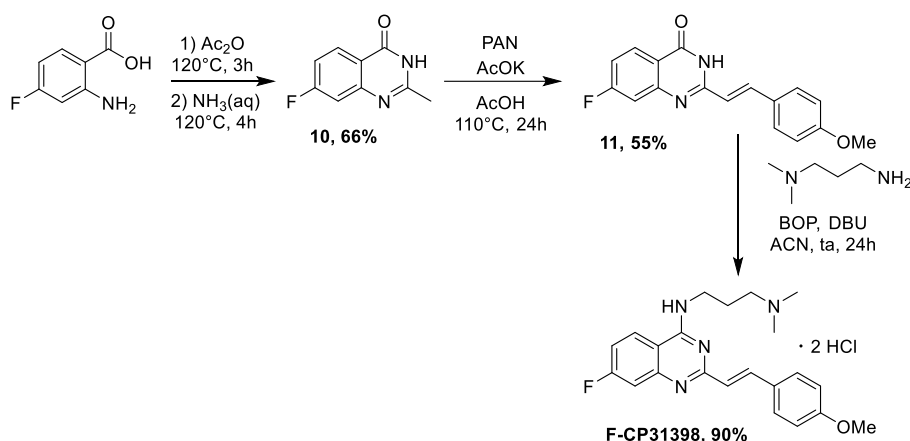


Schéma I.14: Synthèse du composé **F-CP31398**

Par analogie, la synthèse du dérivé bromé **13** à partir de la 7-bromo-2-méthylquinazolin-4(3H)-one commerciale a été réalisée avec un rendement global de 38% sur 2 étapes (Schéma I.15).

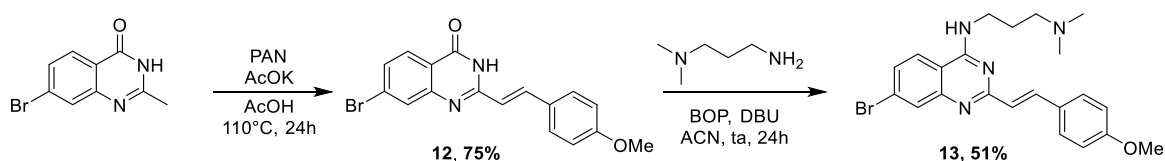


Schéma I.15: Synthèse du dérivé bromé **13**

Plusieurs approches ont alors été étudiées afin d'aboutir à un précurseur de marquage soit sous la forme d'un ester boronique soit sous la forme d'un dérivé stannylé. Afin de former l'ester boronique de pinacol **14**, un couplage de Suzuki-Miyaura a été réalisé entre le composé **13** et le bis(pinacolato)dibore dans un mélange eau/1,4-dioxane à 110°C pendant 18h (Schéma I.16). Dans ces conditions, seul le composé **15** (**CP31398**) a été observé. En revanche, la formation de précurseurs stanniques à partir du composé **13** par couplage de Stille catalysé au palladium dans le 1,4-dioxane à 100°C durant 18h a pu être réalisée à partir de deux sources d'étain. Ainsi, les précurseurs tributylétain **16** et triméthylétain **17** ont été obtenus respectivement avec des rendements de 63% et 69%. Ainsi, les précurseurs **16** et **17** ont été obtenus respectivement avec des rendements globaux de 24% et 26% en 3 étapes.

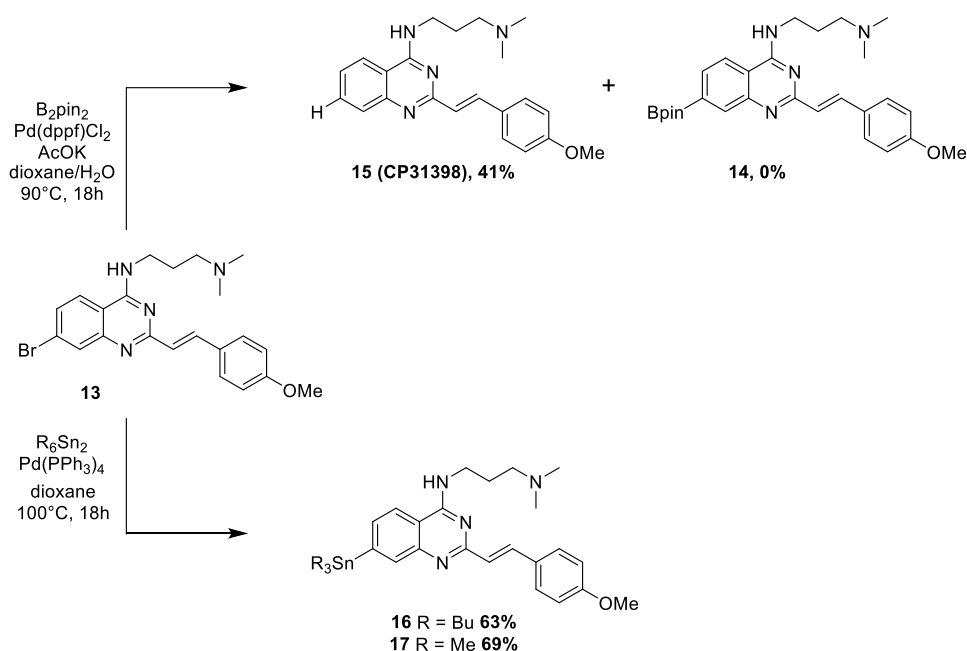


Schéma I.16: Synthèse des précurseurs de marquage du composé F-CP31398

IV. Radiomarquage au carbone-11 des structures moléculaires ciblant p53

IV.1. Marquage isotopique au carbone-11 du composé CP31398

Le marquage isotopique au carbone-11 du composé **CP31398** à partir du phénol **4** (1 mg) a été exploré en utilisant l'iodure de méthyle [^{11}C]CH₃I ou le triflate de méthyle [^{11}C]CH₃OTf comme agents de radiométhylation (Schéma I.17). Différentes conditions réactionnelles (bases, solvants, températures) ont été testées et sont résumées dans le tableau I.2. Les essais de radiomarquage ont été conduits sur des modules de synthèse GE Tracerlab™ FX C Pro et iPhase C-11 Pro2®. Le rendement radiochimique (RRC) est mesuré après purification par HPLC semi-préparative comme le ratio de l'activité de produit final mesurée dans un activimètre par rapport à l'activité initiale de [^{11}C]CH₃I ou [^{11}C]CH₃OTf mesurée dans le réacteur de synthèse.

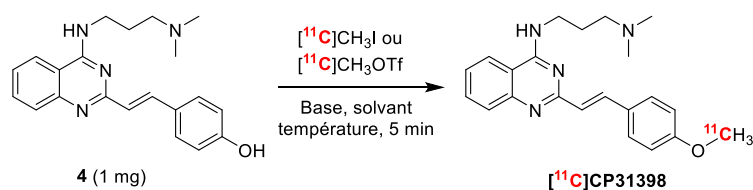


Schéma I.17 : Synthèse du [^{11}C]CP31398 par radiométhylation du composé **4**

Un premier essai de marquage du composé **4** avec du $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ a été mené dans l'acétone en présence de soude à 50 °C durant 5 minutes (Tableau I.2, entrée 1). Dans ces conditions, aucun produit n'a été obtenu. Le même résultat a été observé avec du $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ dans les mêmes conditions (Tableau I.2, entrée 2). L'utilisation d'une autre base comme le carbonate de césium au pKa plus proche de celui du phénol **4** (~10) dans un solvant au point d'ébullition plus élevé comme le DMF a permis d'observer des traces du composé $[^{11}\text{C}]\text{CP31398}$ en HPLC (Tableau I.2, entrée 3). Cependant, la conversion faible ainsi que la détection de nombreux sous-produits (possiblement la formation d'un dérivé triméthylammonium) ont orienté les conditions de réaction vers un changement de base. Ainsi, une réaction de méthylation en présence de *tert*-butanolate de potassium (*t*-BuOK) et de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ a été menée dans le DMF à 80°C (Tableau I.2, entrée 4). Dans ces conditions, des traces de $[^{11}\text{C}]\text{CP31398}$ ont été détectées en HPLC mais n'ont pu être isolées. Afin de réduire la formation de sous-produits présents lors des essais dans le DMF, la réaction a été réalisée dans la 2-butanone. Un premier essai a été réalisé avec du carbonate de césium à 80°C en utilisant le $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ comme agent de méthylation, mais aucun produit n'a pu être détecté dans ces conditions (Tableau I.2, entrée 5). En présence de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ et de *t*-BuOK à 80 °C pendant 5 minutes, des traces du composé $[^{11}\text{C}]\text{CP31398}$ ont été observées sans autres sous-produits que du $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ n'ayant pas réagi (Tableau I.2, entrée 6). Il a donc été décidé de mener ce marquage dans les mêmes conditions en utilisant le $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ plus réactif (Tableau I.2, entrée 7). Dans ces conditions, le composé $[^{11}\text{C}]\text{CP31398}$ a été isolé avec un rendement radiochimique corrigé de la décroissance de $42 \pm 13\%$ ($n = 6$) après purification par HPLC semi-préparative (Figure I.5). Les activités de $[^{11}\text{C}]\text{CP31398}$ obtenues sont comprises entre 300 et 1600 MBq (~500 MBq/mL) ($n = 6$) pour un temps de radiosynthèse de 45 minutes. Ces activités permettront d'effectuer de l'imagerie TEP *in vivo*. En effet, environ 200 MBq/mL sont nécessaires pour l'injection chez le rongeur.

Entrée ^a	Agent de méthylation	Base	Solvant	Température (°C)	RRC (%) ^b
1	[¹¹ C]CH ₃ I	NaOH	Acetone	50	-
2	[¹¹ C]CH ₃ OTf	NaOH	Acetone	50	-
3	[¹¹ C]CH ₃ I	Cs ₂ CO ₃	DMF	80	Traces
4	[¹¹ C]CH ₃ I	<i>t</i> -BuOK	DMF	80	Traces
5	[¹¹ C]CH ₃ OTf	Cs ₂ CO ₃	Butanone	80	-
6	[¹¹ C]CH ₃ I	<i>t</i> -BuOK	Butanone	80	Traces
7	[¹¹ C]CH ₃ OTf	<i>t</i> -BuOK	Butanone	80	42

^aLes expériences ont été réalisées deux fois

^bLe RRC est mesuré comme le ratio de l'activité en [¹¹C]CP31398 isolé après purification par HPLC semi-préparative sur l'activité de [¹¹C]CH₃I ou de [¹¹C]CH₃OTf initiale mesurée dans le réacteur

Tableau I.2: Conditions de radiomarquage testées pour le composé [¹¹C]CP31398

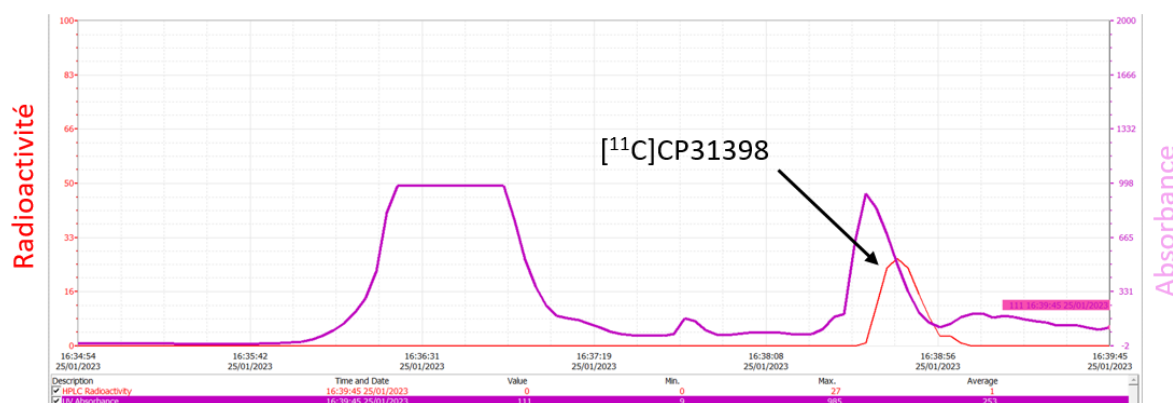


Figure I.5: Purification par HPLC semi-préparative avec détection UV (254 nm, courbe violette) et gamma (courbe rouge) du composé [¹¹C]CP31398 réalisée en phase inverse.

Un contrôle qualité réalisé par HPLC analytique en phase inverse avec détection UV et gamma (Figure I.6) a permis de démontrer que le composé [¹¹C]CP31398 est obtenu avec des puretés chimiques et radiochimiques >99% et une activité molaire de 39 ± 12 GBq/ μ mol ($n = 6$) après reformulation sur une cartouche C18. Cette activité molaire se situe dans l'ordre de grandeur des autres traceurs préparés au laboratoire (entre 30 et 120 GBq/ μ mol), et est compatible avec une injection *in vivo*. Ainsi, l'optimisation des conditions de marquage conduisant au composé [¹¹C]CP31398 a permis d'obtenir le radiotraceur « prêt pour l'injection » avec une quantité d'activité suffisante pour une évaluation *in vivo*.

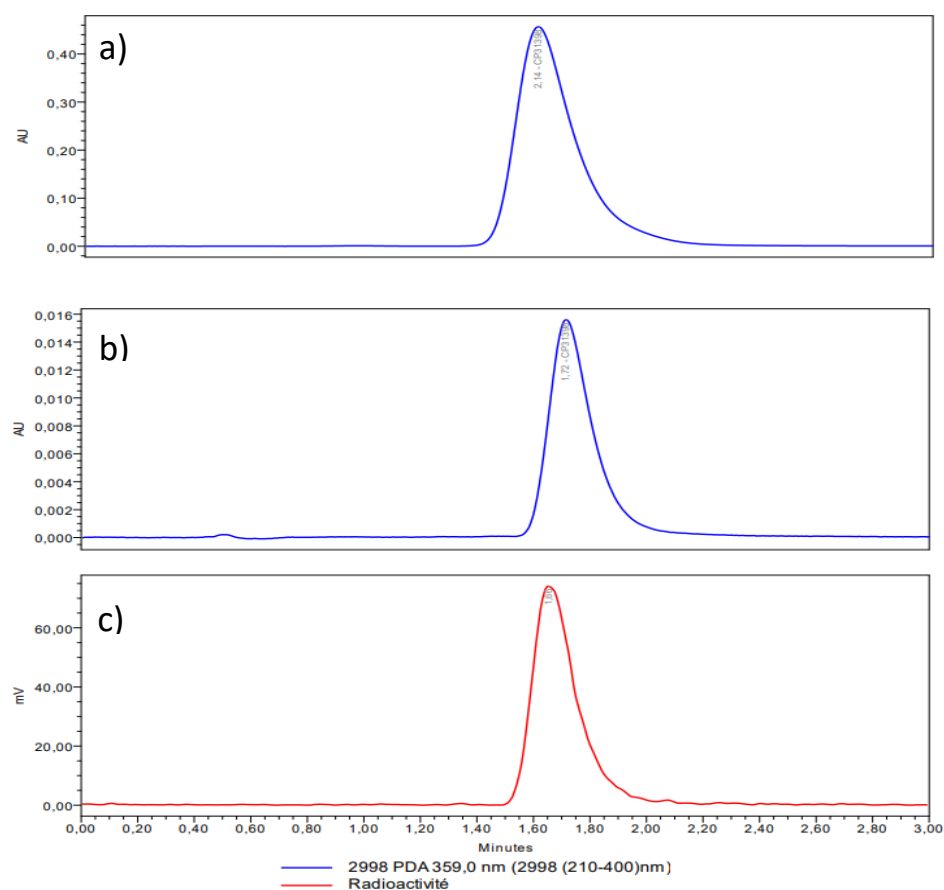


Figure I.6 : Contrôle qualité du [^{11}C]CP31398 réalisé par HPLC analytique avec détection UV (359 nm) et gamma (mV). a) Chromatogramme UV du composé CP31398 de référence non radioactif b) Chromatogramme UV du composé [^{11}C]CP31398 c) Chromatogramme gamma du composé [^{11}C]CP31398

IV. Radiomarquages au fluor-18 des composés PEG-CP31398 et F-CP31398

Radiomarquage du composé PEG-CP31398

Le radiomarquage au fluor-18 du précurseur **9** a été réalisé dans des conditions standards de radiofluoration en présence du complexe $\text{K}[^{18}\text{F}]\text{F-K}_{222}$ dans le DMSO par $\text{S}_{\text{N}}2$ sur le groupement partant tosylate à partir de 4 mg de précurseur (Schéma I.18). Ces essais de marquages ont été conduits sur des modules de synthèse GE Tracerlab[®] FX FN et Trasis AllInOne[®] (AiO). Plusieurs conditions de réaction ont été explorées afin d'optimiser le marquage du précurseur **9** et la conversion radiochimique (RCC) a été évaluée par radio-CCM (Tableau I.3).

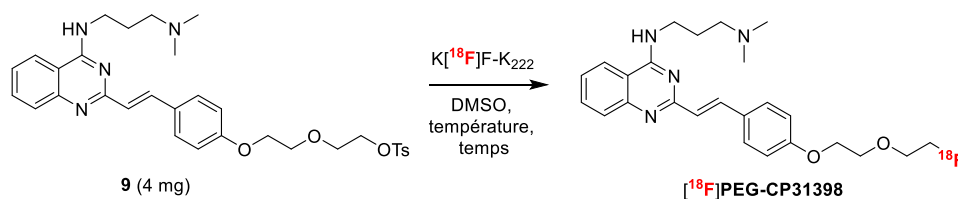


Schéma I.18: Radiomarquage au fluor-18 du composé $[^{18}F]PEG-CP31398$

Le marquage du précurseur **9** a été réalisé dans un premier temps dans le DMSO à 80°C durant 5 et 10 min (Tableau I.3, entrées 1 et 2). Dans les deux cas, une faible conversion de 3% a été observée, 97% de l'activité restante correspondant aux ions $[^{18}F]F^-$ n'ayant pas réagi. Une augmentation de température de réaction à 120°C a permis d'augmenter la conversion jusqu'à 6% (Tableau I.3, entrée 3) alors qu'une température de 160°C durant 5 minutes a permis d'obtenir une conversion en $[^{18}F]PEG-CP31398$ de 37% (Tableau I.3, entrée 4). Un exemple de radio-CCM montrant cette conversion de 37% est présentée en Figure I.7. Afin d'observer si un temps de réaction plus long permettrait d'augmenter cette conversion, la réaction de marquage a été réalisée durant 10 minutes à 160°C (Tableau I.3, entrée 5). Dans ces conditions, une conversion similaire de 31% est mesurée.

Entrée ^a	Température (°C)	Temps (min)	RCC (%) ^b
1	80	5	3
2	80	10	3
3	120	5	6
4^c	140	5	37
5^c	160	10	31

^aLes expériences ont été réalisées une fois

^bLa conversion en $[^{18}F]CP31398$ a été mesurée par radio-CCM par rapport aux ions fluorures n'ayant pas réagi

^cExpériences réalisées deux fois

Tableau I.3: Conditions testées pour le radiomarquage du composé **9** au fluor-18

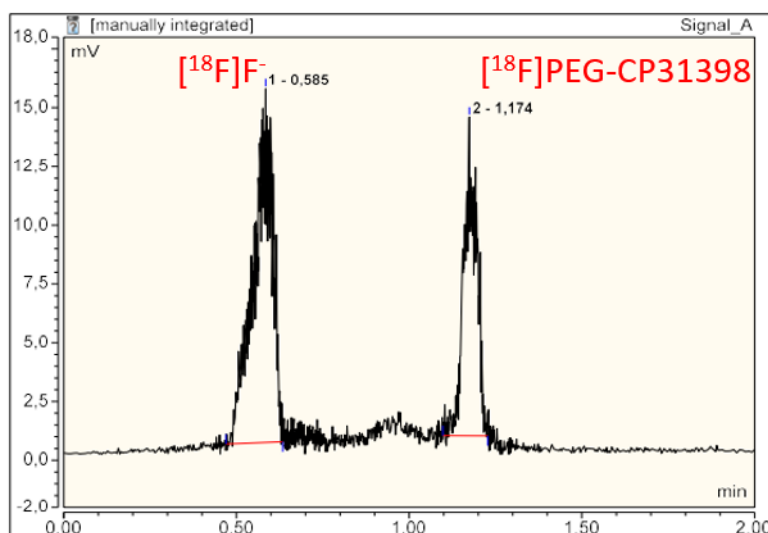


Figure I.7: Radio-CCM montrant la conversion en $[^{18}\text{F}]\text{PEG-CP31398}$ (37%) par rapport aux ions $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$

Le radiomarquage automatisé du composé **9** a été réalisé sur un module de synthèse AiO dans les conditions optimales déterminées précédemment. La purification du composé brut a été réalisée par chromatographie semi-préparative sur colonne Zorbax C18 en utilisant un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{TFA}$ 75/25/0,1 v/v/v comme éluant (Figure I.8). Une étape de formulation sur cartouche C18 a permis d'obtenir le composé $[^{18}\text{F}]\text{PEG-CP31398}$ ($2,3 \pm 1$ GBq) en 50 minutes de synthèse avec un rendement corrigé de la décroissance de $10\% \pm 4$ ($n = 4$).

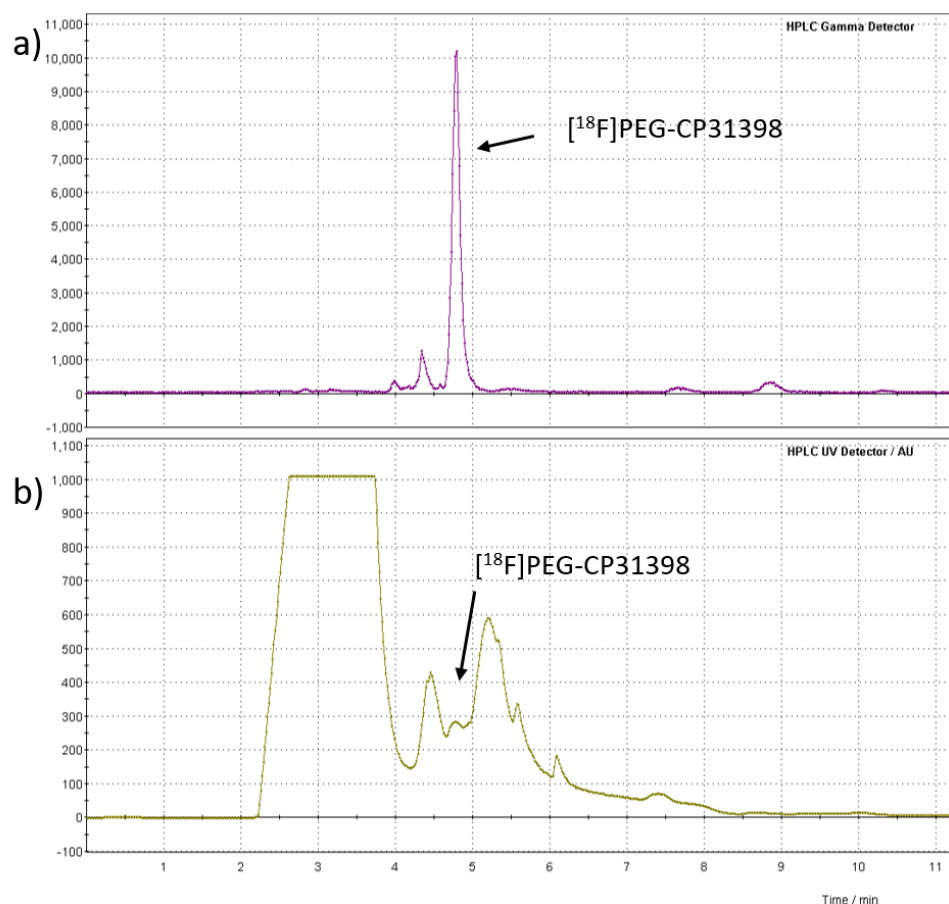


Figure I.8: Purification du [¹⁸F]PEG-CP31398 par HPLC semi-préparative avec détection UV (254 nm) et gamma en phase inverse. a) Chromatogramme gamma du composé [¹⁸F]PEG-CP31398 par HPLC semi préparative en phase inverse b) Chromatogramme UV du composé [¹⁸F]PEG-CP31398 par HPLC semi préparative en phase inverse

Le contrôle qualité a été effectué par HPLC analytique avec une détection UV (254 nm) et gamma afin de s'assurer de la pureté chimique et radiochimique du composé synthétisé (Figure I.9). Le composé [¹⁸F]PEG-CP31398 a été obtenu avec une pureté chimique et radiochimique supérieure à 99% et une activité molaire de 80 ± 39 GBq/ μ mol (n = 4).

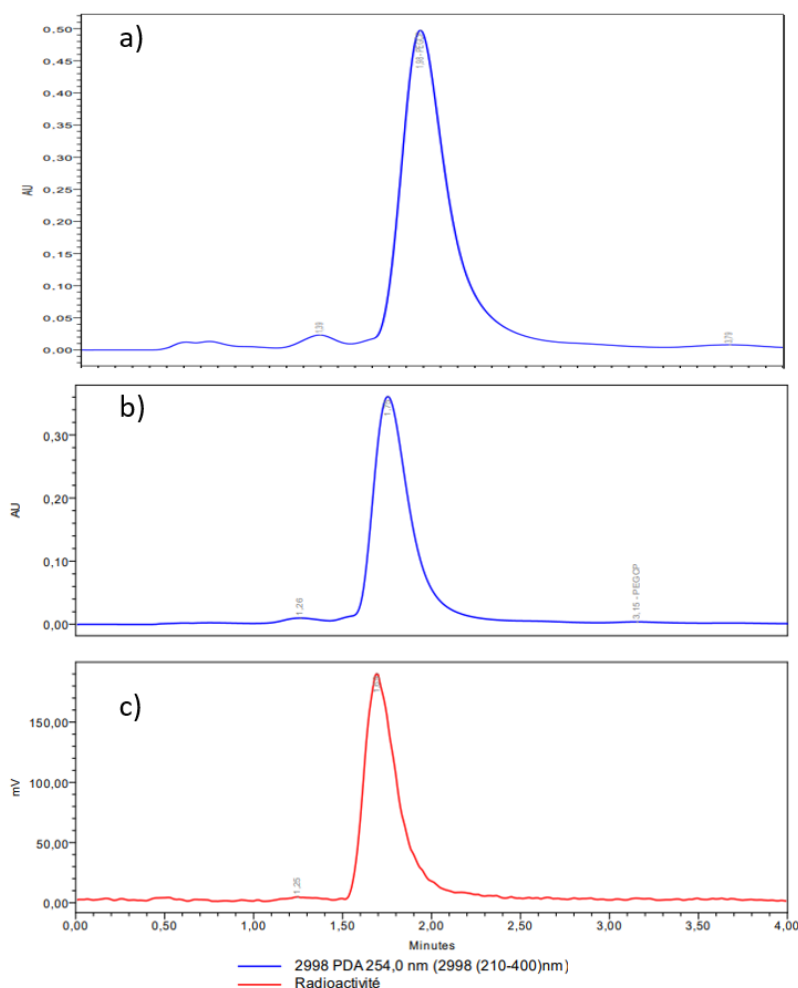


Figure I.9: Contrôle qualité du composé $[^{18}\text{F}]\text{PEG-CP31398}$ réalisé par HPLC analytique avec détection UV (254 nm) et gamma. a) Chromatogramme UV du composé **PEG-CP31398** de référence non radioactif b) Chromatogramme UV du composé $[^{18}\text{F}]\text{PEG-CP31398}$ c) Chromatogramme gamma du composé $[^{18}\text{F}]\text{PEG-CP31398}$

En conclusion, l'optimisation des conditions de marquage du composé $[^{18}\text{F}]\text{PEG-CP31398}$ a permis d'obtenir le traceur « prêt pour injection » avec une quantité d'activité suffisante, une excellente pureté chimique et radiochimique ainsi qu'une activité spécifique permettant d'utiliser ce traceur en imagerie TEP *in vivo*.

Radiomarquage du composé F-CP31398

Afin d'obtenir le radiotraceur $[^{18}\text{F}]\text{F-CP31398}$, la radiofluoration des précurseurs **16** et **17** (4 mg) a été étudiée en s'inspirant des conditions de marquage décrites dans la littérature (Schéma I.19).¹⁶⁶ Ces essais ont été réalisés dans un automate de synthèse AiO.

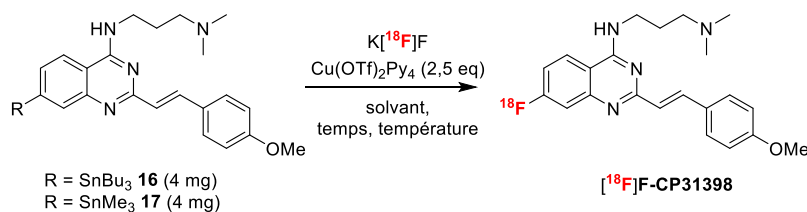


Schéma I.19 : Radiomarquages des précurseurs stannilés **16** et **17** conduisant au composé [¹⁸F]F-CP31398

Les différentes conditions testées sont résumées dans le Tableau I.4. La conversion en [¹⁸F]F-CP31398 a été mesurée par radio-HPLC sur le produit brut. Conformément aux conditions standards de la littérature,¹⁶⁶ 4 mg de précurseurs et 2,5 équivalents (par rapport au précurseur de marquage) de complexe de cuivre (II) ont été utilisés. La radiofluorination du composé **16** réalisée dans le diméthylacétamide (DMA) à 110°C durant 10 minutes, selon les conditions standards de la littérature,¹⁶⁶ n'a pas permis d'observer la formation du composé désiré (Tableau I.4, entrée 1). L'utilisation d'un précurseur triméthyl étain réputé plus réactif dans les mêmes conditions^{167,168} n'a pas non plus montré la formation du composé [¹⁸F]F-CP31398 après 10 ou 20 minutes de réaction (Tableau I.4, entrées 2 et 3). Il a été montré dans la littérature que l'utilisation de 1,2-diméthyl-2-imidazolidinone (DMI) comme solvant donnait de meilleurs résultats que le DMA pour la radiofluorination de dérivés stannilés.¹⁶⁹ Néanmoins, la radiofluorination du précurseur **17** dans le DMI à 110°C pendant 20 minutes n'a pas non plus permis d'observer la formation du composé [¹⁸F]F-CP31398 (Tableau I.4, entrée 3). Enfin, l'augmentation de la température de réaction à 140°C dans les mêmes conditions que précédemment a conduit à l'observation de traces du composé [¹⁸F]F-CP31398 (Tableau I.4, entrée 5). Une température de réaction supérieure conduit à une dégradation du précurseur. Malgré les conditions testées, le composé [¹⁸F]F-CP31398 n'a pas pu être obtenu dans des quantités suffisantes pour envisager une évaluation biologique. La présence d'un groupement amine non protégé sur le noyau aromatique peut s'avérer délétère pour ce type de marquage.^{98,100}

Entrée ^a	Précurseur	Solvant	Temps (min)	Température (°C)	Conversion (%) ^b
1	16	DMA	10	110	-
2	17	DMA	10	110	-
3 ^c	17	DMA	20	110	-
4	17	DMI	20	110	-
5	17	DMI	20	140	<1%

^aLes expériences ont été réalisées en dupliqua

^bLa conversion a été évaluée par radio-HPLC du brut réactionnel

^cExpérience réalisée une seule fois

Tableau I.4: Conditions de radiofluoration testées pour le marquage des précurseurs stannylés **16** et **17**

VI. Evaluation biologique des traceurs ciblant p53

Etude de la liaison entre le composé [¹⁸F]PEG-CP31398 et p53

Si l'affinité du composé **CP31398**, et donc de son homologue marqué isotopiquement au carbone-11, n'est pas à démontrer,^{153,170} il est important de vérifier que les analogues fluorés synthétisés et dont la structure chimique a été modifiée ciblent toujours la protéine. Dans le but d'évaluer leur liaison avec la protéine, un premier test de « binding » a été effectué sur des cellules humaines HEK-293T surexprimant artificiellement la protéine p53. Il consiste à étudier la liaison existante entre la protéine p53 et le traceur à l'équilibre *via* l'introduction d'une quantité croissante de traceur par rapport à une quantité constante de cellules, et donc de protéine. En collaboration avec le laboratoire SIMOS du CEA-Saclay, ces cellules ont été cultivées puis transfectées avec un plasmide GFP-p53 afin d'obtenir une surexpression de la protéine dans les cellules, la « Green Fluorescent Protein » (GFP) servant de témoin pour la bonne réalisation de la transfection. En effet, une expérience de microscopie par fluorescence a bien démontré une co-localisation de la GFP avec les cellules HEK-293T (Figure I.10), indiquant que les cellules ont bien internalisé le plasmide et donc expriment la protéine p53.

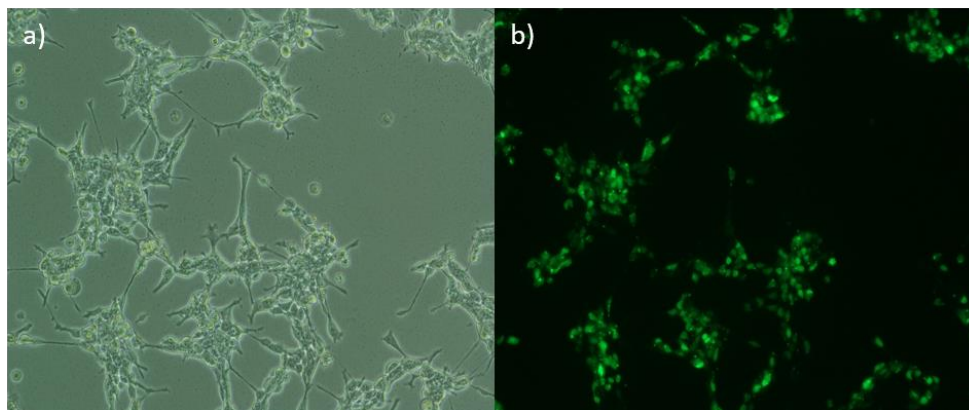


Figure I.10: Microscopie (Nikon Eclipse TI, grossissement x10) réalisée sur cellules HEK-239T transfectées avec le plasmide GFP-p53. a) Observation des cellules HEK-239T transfectées b) Microscopie de fluorescence montrant la co-localisation des cellules avec la GFP

Les cellules transfectées ont alors été incubées pendant 90 min à 37 °C avec différentes concentrations (1, 10 et 50 nM) du composé [^{18}F]PEG-CP31398 puis, après plusieurs lavages et centrifugations, l'activité du culot cellulaire est mesurée au compteur gamma (Figure I.11). Une augmentation de la radioactivité est observée dans les cellules avec l'augmentation de la concentration en [^{18}F]PEG-CP31398, démontrant ainsi la fixation du composé sur les cellules. Afin de vérifier que la radioactivité mesurée est bien due à une fixation spécifique du traceur [^{18}F]PEG-CP31398, une expérience de pré-saturation a alors été réalisée. Elle a pour but de saturer les sites de fixation possibles du radiotraceur avec son équivalent non radioactif (CP31398), ne laissant alors libres que les sites de fixation non spécifiques qui sont, par définition, non saturables. Ainsi, dans cette expérience, les cellules sont dans un premier temps incubées avec une grande quantité (excès molaire d'un facteur 100) de composé CP31398 non radioactif (saturation des sites de fixation spécifiques) avant l'incubation avec les mêmes concentrations (1, 10 et 50 nM) de [^{18}F]PEG-CP31398 que précédemment (Figure I.11). Dans ces conditions de pré-saturation, une extinction significative ($p < 0.0005$) d'environ 80% du signal radioactif est observée dans les cellules incubées avec 50 nM de [^{18}F]PEG-CP31398, démontrant une fixation spécifique du radiotraceur dans les cellules. Cette expérience montrerait donc que la proportion de liaisons non spécifiques sur les cellules est d'environ 20%. Cette fixation du traceur non spécifique peut être liée à une liaison du composé sur la membrane des cellules, ou bien à des amas de protéines présents dans le milieu d'incubation.

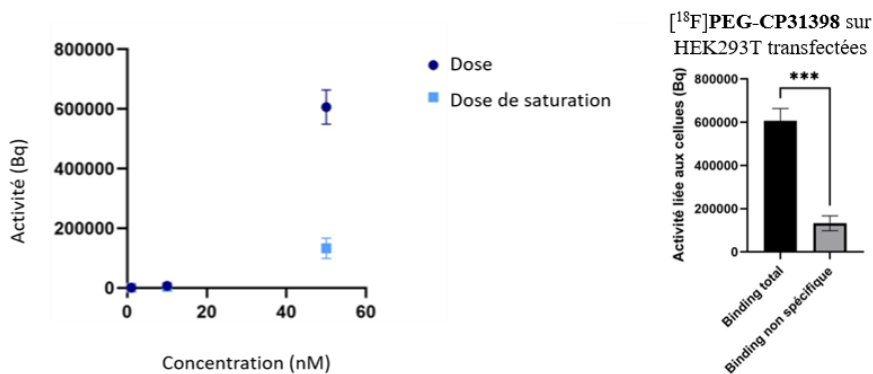


Figure I.11: Expériences de binding sur cellules HEK-293T transfectées avec le plasmide GFP-p53 à différentes concentrations (1, 10 et 50 nM) de [¹⁸F]PEG-CP31398 avec (●) et sans (■) pré-saturation avec 100 équivalents de CP31398.

Afin de déterminer si la fixation spécifique observée pour le composé [¹⁸F]PEG-CP31398 correspond à une fixation sur la protéine p53, deux expériences de retard sur gel (electrophoretic mobility shift assay) ont été menées. Elles ont pour but d'identifier la liaison spécifique du traceur avec la protéine p53, soit dans les cellules transfectées, soit en présence de la protéine p53 humaine recombinante isolée. Pour cela, deux expériences ont été menées en parallèle. Elles permettent dans un premier temps de visualiser la migration de la protéine p53 (53 kDa) sur le gel, révélée par Western Blot, puis dans un second temps d'observer grâce à la radioactivité, la fixation du traceur [¹⁸F]PEG-CP31398 sur la protéine p53, soit exprimée par les cellules HEK-293T transfectées, soit directement par incubation avec la protéine isolée.

Ainsi, le traceur [¹⁸F]PEG-CP31398 a été incubé durant 90 min à 37 °C soit avec des cellules HEK-293T transfectées qui ont ensuite été lysées, soit en présence de la protéine p53 recombinante. Ces deux échantillons ont été soumis à une migration sur gel à 4 °C et à 100 V durant 120 minutes en présence de Précision Plus Dual Color, un marqueur de poids moléculaire. Deux gels similaires ont été réalisés en parallèle, un révélé en Western Blot grâce à un anticorps anti-p53 suivi d'un anticorps secondaire fluorescent, afin de déterminer la migration de la protéine p53 sur le gel, l'autre révélé par autoradiographie, permettant d'observer la migration de la radioactivité sur le gel (Figure I.12). Une distance de migration identique de la radioactivité et de la protéine indiquerait la fixation spécifique du traceur sur la protéine.

L'expérience de migration révélée par Western Blot (Figure I.12a) permet d'observer la présence de la protéine p53, aussi bien dans le lysat de cellules HEK qu'avec la protéine isolée.

Cette expérience confirme d'une part la présence de p53 dans le lysat de cellules HEK transfectées, appuyant les résultats de microscopie de fluorescence, mais également que la protéine ne s'est pas dégradée lors de l'incubation avec le radiotraceur. En revanche, les expériences d'autoradiographie (Figure I.12b) ne permettent pas de co-localiser le signal radioactif du composé [^{18}F]PEG-CP31398 avec la protéine. Ces résultats semblent indiquer que le composé [^{18}F]PEG-CP31398 ne s'est pas fixé à la protéine p53 dans ces conditions. Plusieurs hypothèses peuvent alors être émises. Il est possible que les modifications chimiques réalisées sur le composé [^{18}F]PEG-CP31398 par rapport au composé de référence CP31398 aient engendré une perte de l'affinité pour la protéine. Une autre hypothèse serait que la liaison entre le traceur et la protéine se soit rompue sur le gel lors de la migration, expliquant alors que la radioactivité soit détectée au niveau des plus bas poids moléculaires. Enfin, il est possible que le traceur [^{18}F]PEG-CP31398 se soit dégradé sur le gel. Il est donc possible que la technique de migration sur gel ne soit pas adaptée à l'étude de l'interaction traceur-protéine. Afin de vérifier cette hypothèse, d'autres expériences doivent être réalisées.

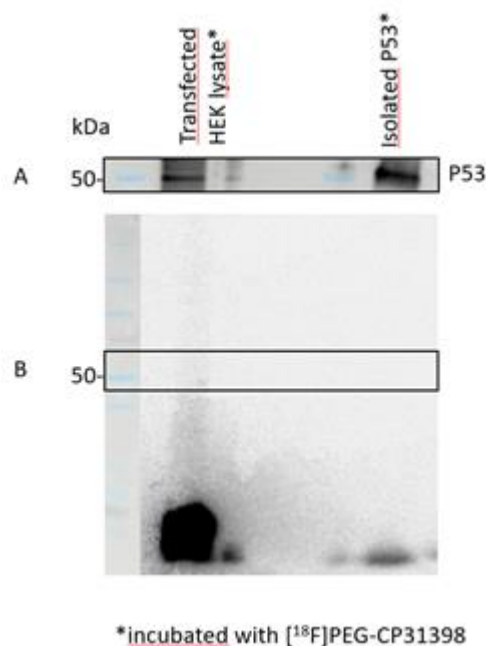


Figure I.12: Caractérisation de l'interaction traceur-protéine p53 par électrophorèse. A) Détection par Western Blot de la protéine p53 dans le lysat des cellules HEK-293T transfectées (gauche) ou en présence de la protéine p53 isolée (droite) après incubation avec le composé [^{18}F]PEG-CP31398 ; B) Autoradiographie du gel de migration des cellules HEK-293T transfectées (gauche) et de la protéine p53 isolée (droite) après incubation avec le traceur [^{18}F]PEG-CP31398

Autoradiographies sur coupes de tumeurs

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle le traceur ou la liaison traceur – protéine p53 pourrait se dégrader sur le gel de migration, des autoradiographies sur coupes de tumeurs exprimant p53 incubées avec le composé [¹⁸F]PEG-CP31398 ont été envisagées. Pour cela, 6 lignées de ^{VI.2}cellules tumorales ont été analysées par immunohistochimie afin de vérifier la présence de la protéine p53 grâce à un anticorps anti-p53 de lapin et en présence d'un anticorps secondaire fluorescent. Les coupes de tumeur H358 humaine (cancer du poumon) ont montré une expression de p53 localisée dans les cellules grâce à une co-localisation avec du 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI), un marqueur du noyau cellulaire (Figure I.13a). A l'inverse, la lignée A549 humaine (cancer du poumon) n'exprime pas la protéine p53 à un niveau détectable par cette technique et jouera donc le rôle de contrôle négatif (Figure I.13c). Afin de vérifier l'absence de fixation non spécifique de l'anticorps anti-p53 et de valider ces résultats, des expériences de contrôle consistant à incuber les cellules en l'absence de l'anticorps anti-p53 mais en présence de l'anticorps secondaire ont été réalisées (Figure I.13b et I.13d). Dans ces expériences, aucune fluorescence n'est observée, démontrant que le signal fluorescent observé sur les cellules H358 est bien dû à une fixation de l'anticorps anti-p53 (Figure I.13a).

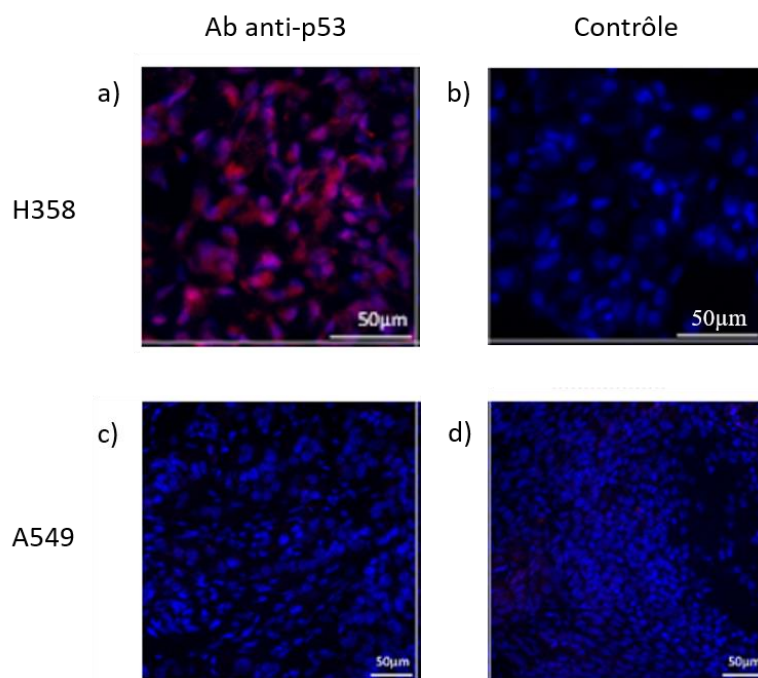
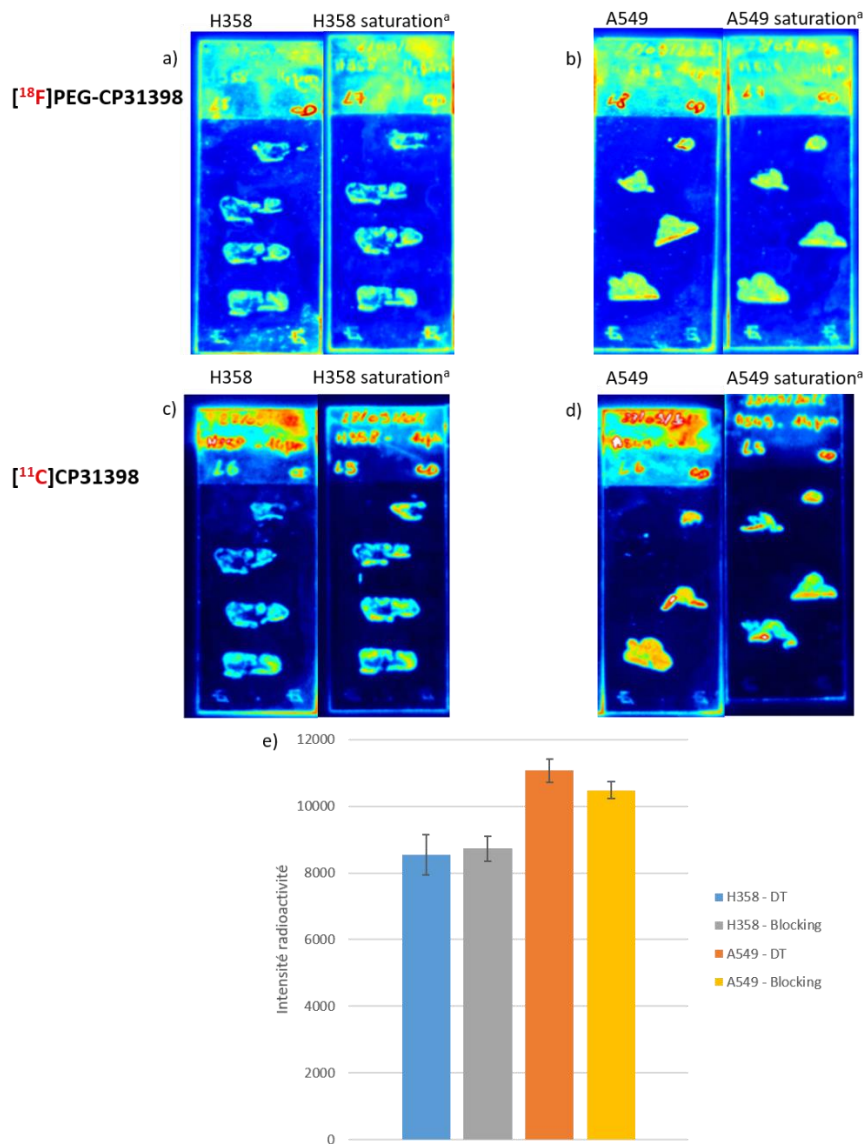


Figure I.13: Immunohistochimie sur coupe de tumeur pour la détermination de la présence de p53. a) Coupe de tumeur du poumon humaine H358 en présence de DAPI, d'un anticorps primaire anti-p53 et d'un anticorps secondaire fluorescent b) Coupe de tumeur du poumon humaine H358 en présence de DAPI et d'un anticorps secondaire fluorescent c) Coupe de tumeur du poumon humaine A549 en présence de DAPI, d'un anticorps primaire anti-p53 et d'un anticorps secondaire fluorescent d) Coupe de tumeur du poumon humaine A549 en présence de DAPI et d'un anticorps secondaire fluorescent

Ces deux lignées tumorales ont donc été sélectionnées afin de réaliser des autoradiographies avec les traceurs [^{11}C]CP31398 et [^{18}F]PEG-CP31398 (Figure I.14). Des expériences de saturation ont également été réalisées avec les composés non radioactifs sur des coupes adjacentes. Les autoradiographies montrent une fixation des deux radiotraceurs sur les deux lignées H358 (p53⁺) et A549 (p53⁻). Les expériences de saturation montrent une absence de déplacement du signal radioactif pour les deux lignées (Figure I.14.e). La fixation des composés [^{11}C]CP31398 et [^{18}F]PEG-CP31398 sur les cellules H358 et A549 est donc non spécifique et pourrait être causée par une affinité membranaire. Ces résultats ne semblent pas confirmer les observations réalisées sur les cellules transfectées surexprimant p53. Ces observations ne semblent pas dues aux dérivations chimiques réalisées avec l'introduction d'une chaîne aliphatique comportant un atome de fluor sur le motif CP31398 puisque le composé radiomarqué isotopiquement [^{11}C]CP31398 présente lui aussi cette fixation non spécifique inconnue (Figure I.14). Ces résultats pourraient s'expliquer par le niveau d'expression variable de la protéine p53 sur ces coupes de tumeur qui n'a pas été quantifié. Le fait qu'une liaison spécifique entre les traceurs développés et la protéine p53 n'a pas pu être démontrée fait échos au fait que le mécanisme d'action du composé CP31398, n'est pas clairement élucidé. En effet, le composé CP31398 fonctionnerait comme un protecteur de p53 vis-à-vis de sa dénaturation et stabiliserait sa conformation active lors de sa biosynthèse, restaurant ainsi son activité biologique.^{153,171} Néanmoins, d'autres études indiquent que le composé CP31398 se lierait à l'ADN et non à p53, mais le mécanisme d'action n'est pas encore clairement élucidé.¹⁷²



^aLes expériences de saturation ont été menées avec 3 mg/mL de composé non radioactif

Figure I.14: Autoradiographies sur coupes de tumeurs du cancer du poumon humaine a) avec le composé $[^{18}\text{F}]\text{PEG-CP31398}$ sur cellules H358 ($p53^+$) et expérience de saturation avec le composé PEG-CP31398 ; b) avec le composé $[^{18}\text{F}]\text{PEG-CP31398}$ sur cellules A549 ($p53^-$) et expérience de saturation avec le composé PEG-CP31398 ; c) avec le composé $[^{11}\text{C}]\text{CP31398}$ sur cellules H358 ($p53^+$) et expérience de saturation avec le composé CP31398 ; d) avec le composé $[^{11}\text{C}]\text{CP31398}$ sur cellules A549 ($p53^-$) et expérience de saturation avec le composé CP31398 ; e) comparatif quantitatif du marquage des tissus H358 et A549 avec et sans saturation (cps)

VII. Conclusions et perspectives

La possibilité de détecter la présence de la protéine p53 mutée *in vivo* en oncologie grâce à l'imagerie TEP serait un outil puissant pour le suivi thérapeutique et le développement de traitement tout en s'inscrivant dans une démarche de médecine personnalisée. Dans ce contexte,

le composé **CP31398**, un médicament en phase de développement ciblant la protéine p53 pour en rétablir ses fonctions biologiques, ainsi que son précurseur de marquage ont été synthétisés en 2 et 3 étapes de synthèse respectivement avec des rendements globaux de 69% et 52%. Le radiomarquage isotopique au carbone-11 de ce composé a été optimisé et automatisé, conduisant à l'obtention du composé [¹¹C]**CP31398** « prêt pour l'injection » avec un rendement de 42 ± 13 % corrigé de la décroissance et une activité molaire de 39 ± 12 GBq/ μ mol (n = 6). Deux analogues fluorés ont également été développés. Dans un premier temps, le **PEG-CP31398** et son précurseur de marquage ont été synthétisés en 4 étapes de synthèse avec des rendements globaux de 20% et 13% respectivement. Le radiomarquage au fluor-18 de cette structure a été automatisé, aboutissant au composé [¹⁸F]**PEG-CP31398** avec un rendement radiochimique de 10 ± 4 % corrigé de la décroissance et une activité spécifique de 80 ± 39 GBq/ μ mol (n = 4). Enfin, un deuxième analogue fluoré, le **F-CP31398** et son précurseur de marquage ont été synthétisés en 4 et 3 étapes avec des rendements globaux de 33% et 26 %. Cependant, malgré les différentes tentatives de radiomarquage réalisées, le radiotraceur correspondant n'a jamais pu être isolé.

Les traceurs développés ont été soumis à une évaluation biologique afin de vérifier leur ciblage de p53. Les différentes expérimentations réalisées *in vitro* telles que les migrations sur gel de lysat de cellules transfectées ainsi que les autoradiographies sur coupes de tumeur n'ont pas permis de démontrer une fixation spécifique des traceurs sur p53, mais ont montré une fixation non spécifique des radiotraceurs.

Le mécanisme de restauration de l'activité biologique de la protéine p53 mutée n'étant pas totalement élucidé, cette cible représente un challenge quant à sa détection par des molécules radiomarquées spécifiques. Cette constatation associée aux résultats de nos travaux nous pousse à ne pas poursuivre l'évaluation de cette famille de traceurs. Dans une démarche éthique avec la volonté de limiter l'utilisation d'animaux à des expérimentations indispensables, une injection *in vivo* sur des modèles xénogreffés ne sera donc pas explorée. Ces résultats posent aussi la question de la pertinence de cibler p53 en imagerie TEP. Les prochaines études devront en tout cas s'appuyer sur des molécules dont la fixation à la protéine est clairement avérée et qui aujourd'hui, au meilleur de nos connaissances, n'existent pas.

CHAPITRE II :
DÉVELOPPEMENT DE
RADIOTRACEURS POUR
L'IMAGERIE TEP DE LA PROTÉINE
FOCAL ADHESION KINASE

I. La Focal Adhesion Kinase : une protéine oncogène

Structure de la protéine

La protéine Focal Adhesion Kinase (FAK) a été identifiée en 1992 par dépistage de protéines de la famille des tyrosines kinases.¹⁷³ C'est une protéine cytoplasmique de 125 kDa codée par un gène situé sur le chromosome 8. FAK est une protéine ubiquitaire exprimée dans la plupart des tissus et cellules du corps humain et se situe au niveau du complexe d'adhérence.¹⁷⁴ Elle est composée de trois domaines principaux : un domaine amino-terminal et un domaine carboxy-terminal qui délimitent un domaine central conférant l'activité catalytique.

La région FAT (Focal Adhesion Targeting), localisée dans le domaine carboxy-terminal, joue un rôle dans la localisation de la protéine au niveau du complexe d'adhérence par l'intermédiaire de liaisons avec d'autres protéines comme la taline et la paxiline.¹⁷⁵

La région amino-terminale, quant à elle, contient une séquence FERM (four-point-one protein, ezrine, radixine, moésine) qui est impliquée dans les interactions avec les domaines cytoplasmiques de récepteurs transmembranaires tels que l'EGFR et la sous-unité β des intégrines, elles-mêmes participant à l'adhésion cellulaire ainsi qu'à la diffusion de messages de signalisation cellulaire régulant le cycle de vie des cellules.¹⁷⁶

Enfin, la région centrale, aussi appelée domaine catalytique, est très similaire aux autres récepteurs de type tyrosine kinase.¹⁷⁷ Elle comporte une région riche en proline permettant l'interaction avec les groupements phosphates de l'ATP par l'intermédiaire d'ions Mg^{2+} .

I.2.

Voies de signalisation cellulaires et fonctions biologiques

Plusieurs mécanismes gouvernent l'activation de FAK. En effet, différentes protéines peuvent procéder à son activation comme les intégrines par exemple.¹⁷⁸ Après réception de stimuli provenant de la matrice extracellulaire, un mécanisme d'auto-phosphorylation sur un résidu tyrosine libère FAK de son auto-inhibition par le domaine FERM, lui faisant ainsi adopter sa conformation active. Dans cette conformation, le site de liaison de la protéine Src présente dans le milieu intracellulaire est alors accessible, permettant la formation d'un complexe FAK/Src. Se déclenche alors une cascade de phosphorylations et d'interactions protéiques conduisant à l'activation de différentes voies de signalisation cellulaires (Figure II.1).^{179,180}

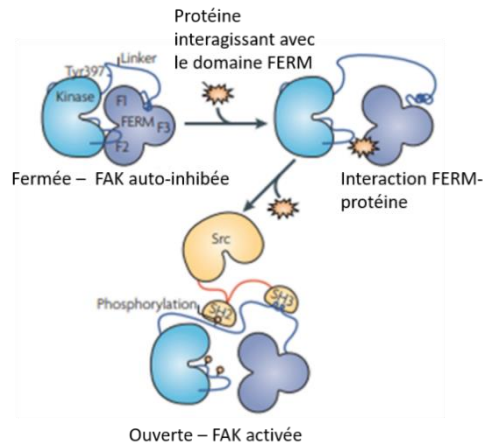


Figure II.1: Processus d'activation de FAK et interactions avec la protéine Src¹⁸¹

La protéine FAK est au centre d'interactions multiples qui participent à la régulation globale de la vie cellulaire. En effet, FAK est impliquée dans les processus de migration cellulaire, de survie, de prolifération et d'apoptose.^{179,182-184} FAK a également un rôle dans le développement cellulaire. Ce rôle a été mis en évidence par l'apparition de modèle FAK K-O. En effet, la délétion de FAK a révélé l'importance de la présence de cette protéine dans la construction du réseau cardio-vasculaire ainsi que dans le développement du réseau neuronal, la protéine étant impliquée dans les processus de myélinisation et dans la formation des synapses.^{185,186}

I.3.

Implication de FAK dans le cancer

La protéine FAK a été décrite comme jouant un rôle dans la cancérogénèse du fait de son implication dans de nombreux processus cellulaires. L'évaluation de la surexpression de FAK en oncologie est le plus souvent réalisée par immunohistochimie, en présence d'un anticorps anti-FAK, après prélèvement d'un échantillon de tumeur sur le patient par chirurgie.¹⁸⁷ Une surexpression de FAK a ainsi été observée dans un grand nombre de cancers, comme les cancers du sein, de la thyroïde, du colon, de la prostate, du poumon, de l'estomac ou encore des ovaires.¹⁸⁸⁻¹⁹⁰ Par exemple, le groupe de Sulzmaier *et al.* a montré que les niveaux d'ARN messager (ARNm) de FAK sont augmentés dans les cancers du sein invasifs ainsi que dans les tumeurs ovariennes agressives (Figure II.2).¹⁹¹

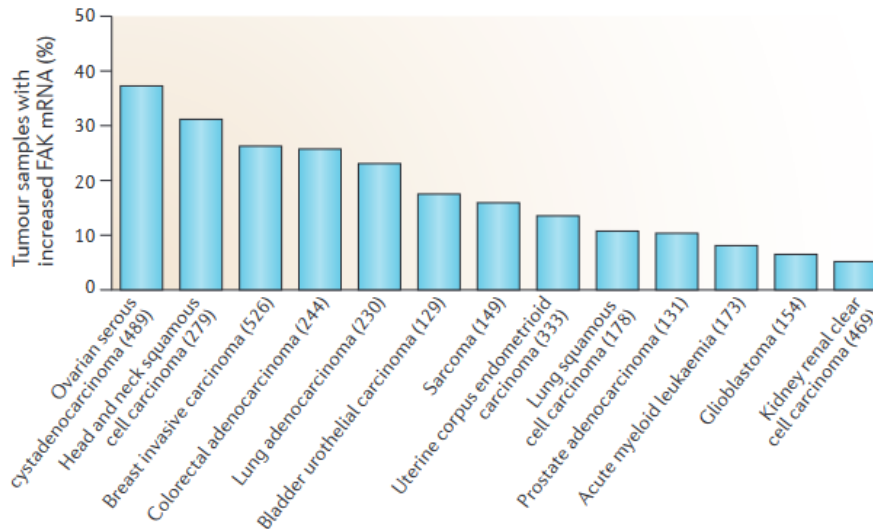


Figure II.2: Surexpression de l'ARNm de FAK dans différents échantillons de tumeurs d'après Sulzmaier *et al.*¹⁹¹

De plus, il a été montré par le groupe de Cance *et al.* que l'expression de la protéine FAK est corrélée au stade bénin ou avancé du cancer du sein.¹⁹² Par ailleurs, il a été démontré que l'activité de FAK augmentait avec l'agressivité de la tumeur.¹⁹³ Ces résultats montreraient donc que cette protéine représenterait un marqueur de l'avancée et de l'agressivité tumorale. Cependant, le groupe de Furuyama *et al.* a montré dans une étude contradictoire qu'il n'y avait pas de valeur pronostique dans la sur-activation et la surexpression de FAK dans certaines formes du cancer du pancréas.¹⁹⁴ Ces études témoignent donc de la complexité du rôle de la protéine et de son implication dans le cancer.

Par ailleurs, la protéine FAK est également impliquée dans la survie cellulaire, l'expression de sa forme active permettant la suppression du phénomène d'anoïkose dans les cellules Madin Darbin canine kidney (MDCK), apoptose particulière dans laquelle les intégrines n'ont plus de lien avec la matrice extracellulaire.¹⁹⁵ En outre, il a été montré que le signal de survie déclenché par FAK pourrait inhiber la voie apoptotique générée par p53, favorisant ainsi la survie des cellules cancéreuses.¹⁹⁶ De plus, la protéine FAK participe en tant que régulateur de la migration cellulaire et donc, dans une moindre mesure, de l'invasion des cellules tumorales.¹⁹⁷ La protéine FAK joue également un rôle dans l'évasion immunitaire et son inhibition aurait un effet synergique avec l'immunothérapie.¹⁹⁸

En résumé, même si certaines études sont contradictoires sur les rôles et les implications précis de FAK dans le cancer, elles s'accordent sur le fait que cette protéine favorise la croissance et

l'expansion des cellules tumorales *via* son implication dans les mécanismes cellulaires de prolifération et de survie.

Thérapies ciblées contre FAK

Par sa localisation au centre de multiples voies de signalisation cellulaire conduisant à la cancérogénèse, la protéine FAK est une cible pertinente pour le développement de thérapies ciblées et notamment d'inhibiteurs de cette protéine. En effet, le groupe de Serrels *et al.* a démontré que l'inhibition de la protéine FAK par des petites molécules conduirait à une régression tumorale par l'intermédiaire du système immunitaire.¹⁹⁹

Ainsi, différentes molécules inhibitrices ont été développées, dont certaines jusqu'en phase clinique. Elles peuvent être classées selon trois catégories : les inhibiteurs du domaine kinase, les inhibiteurs allostériques et enfin les molécules bloquant les interactions de FAK avec d'autres protéines.

Inhibiteurs du domaine kinase

Les molécules développées pour inhiber l'activité kinase de FAK possèdent des structures analogues à l'ATP. Elles peuvent donc prendre la place de ce ligand naturel en interagissant avec le site actif de la protéine par l'intermédiaire de liaisons faibles de type Van der Waals. Le problème majeur rencontré avec ce type de molécules est la faible sélectivité pour la cible, du fait de la forte similarité des sites de fixations de l'ATP avec d'autres kinases par exemple. En terme de structure, ces inhibiteurs comportent au moins un résidu hétérocyclique polysubstitué, comme des noyaux pyridine ou pyrimidine. Des exemples d'inhibiteurs du domaine kinase sont présentés dans le tableau II.1 et en figure II.3.

Composé	IC ₅₀ FAK	IC ₅₀ ^a	Cancer ciblé	Phase de développement
PF-573	4 nM	>1000 nM (PLK1, VEGFR2)	Sein, prostate	Préclinique
TAE-226	5,3 nM	5 nM (Pyk2)	Gliome, ovaires	-
GSK-2256098	10 nM	>1000 nM (Pyk2)	Ovaires, pancréas	Phase II
VS-6063	0,6 nM	0,6 nM (Pyk2)	Ovaires	Phase II

^aIC₅₀ mesuré pour d'autres protéines

Tableau II.1: Affinité et développement clinique d'inhibiteurs du domaine kinase de FAK

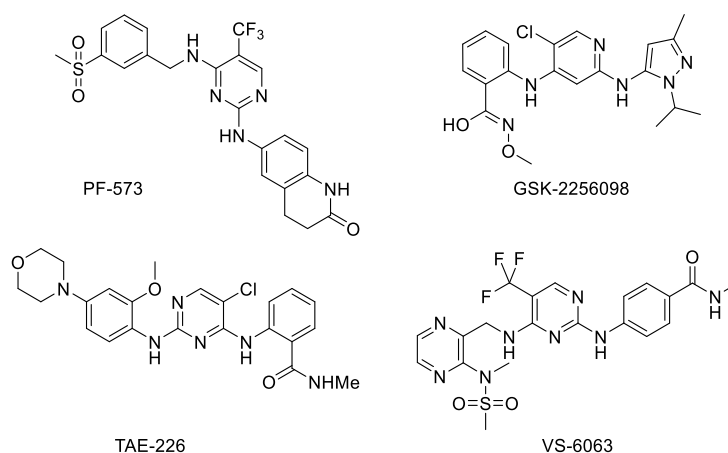


Figure II.3: Exemples de structures d'inhibiteurs du domaine kinase de FAK

Il existe également une sous catégorie d'inhibiteurs interagissant avec la région charnière qui permet l'adoption de la conformation tridimensionnelle active de FAK, indispensable à la réalisation de ses fonctions biologiques. Des inhibiteurs de cette région ont été découverts par le groupe de Grädler *et al.* par criblage haut débit et possèdent une capacité d'inhibition de FAK submicromolaire (Figure II.4).²⁰⁰

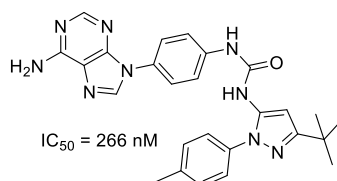


Figure II.4: Exemple d'inhibiteur de la région charnière de FAK

Inhibiteurs allostériques

Les inhibiteurs allostériques de FAK interagissent avec une poche allostérique de la protéine

qui n'est ni le lieu de liaison de l'ATP ni la région charnière. Golubovaskaya *et al.* ont identifié une petite molécule capable d'inhiber les fonctions de FAK en bloquant la phosphorylation d'un résidu tyrosine et donc l'interaction avec la protéine Src (Figure II.5).²⁰¹ Cette molécule permettrait la réduction du volume tumoral sur des modèles murins de cancer du sein.

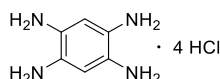


Figure II.5: Inhibiteur allostérique de FAK développé par Golubovaskaya *et al.*²⁰¹

Inhibiteurs ciblant les interactions FAK-protéines

Le groupe de Kurenova *et al.* a identifié une molécule permettant d'inhiber l'interaction de FAK avec le récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire 3 (VEGFR3) impliqué dans l'angiogenèse et la croissance tumorale (Figure II.6).²⁰² Le composé **C4** se lie dans une poche du domaine FAT, empêchant la liaison avec VEGFR3 et permet la réduction tumorale dans un modèle murin xénotransplanté de cancer du sein exprimant VEGFR3.

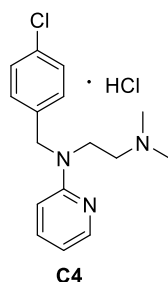


Figure II.6: Inhibiteur de la liaison FAK-VEGFR3 développé par Kurenova *et al.*²⁰²

1.5.

Imagerie de FAK

Plusieurs études ayant pour but d'imager FAK et ses interactions afin de comprendre les mécanismes cellulaires impliqués par ses voies de signalisation ont été publiées. Par exemple, le groupe de Canel *et al.* a imagé la migration cellulaire tumorale ainsi que la voie de signalisation découlant de l'inhibition de la protéine FAK par fluorescence *in vivo* sur un modèle de souris avec implantation d'une fenêtre optique.²⁰³

Dans une autre étude, le groupe de Seong *et al.* a utilisé des bio-senseurs ciblant FAK pour réaliser de l'imagerie par transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET).²⁰⁴ Cet outil

a été utilisé pour l'évaluation en temps réel du niveau d'expression de FAK pour la compréhension des voies cellulaires impliquées et non dans un but de diagnostic oncologique.

Plus récemment, le groupe de Fang *et al.* a développé plusieurs traceurs marqués au fluor-18 pour l'imagerie TEP de la protéine FAK et la détection de cancers.²⁰⁵⁻²⁰⁷ Ces traceurs s'inspirent des inhibiteurs du domaine kinase de FAK, comprenant un noyau pyrimidine. Après avoir mesuré l'IC₅₀ des molécules obtenues, la capacité des traceurs marqués au fluor-18 à détecter de cellules tumorales sur des modèles murins de tumeurs du sarcome S180 a été évaluée. Malgré une fixation non spécifique importante, ces traceurs permettraient la détection des tumeurs *in vivo* (Figure II.7)

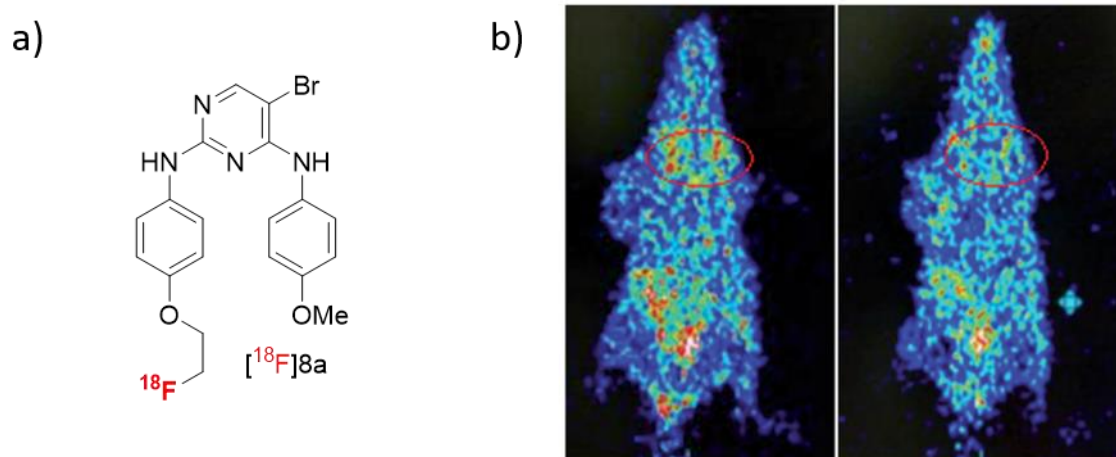


Figure II.7: Imagerie TEP de la protéine FAK réalisée par le groupe de Fang *et al.*²⁰⁵ a) structure du traceur ciblant FAK ; b) images TEP sur modèle murin de tumeur du sarcome S180 à 60 minutes (gauche) et 120 minutes (droite) avec le traceur [¹⁸F]8a

En conclusion, la protéine FAK est un biomarqueur pertinent pour évaluer l'agressivité tumorale. L'imagerie TEP de FAK est alors un outil prometteur pour permettre d'orienter vers un traitement plus personnalisé mais aussi pour soutenir le développement de thérapies ciblées. De plus, il existe de nombreux inhibiteurs de la protéine dont la structure peut servir de base au développement de radiotraceurs originaux.

II.1.

II. Développement de radiotraceurs pour l'imagerie TEP de FAK

Inhibiteurs sélectifs de FAK

Dans le but d'observer la surexpression de la protéine FAK grâce à l'imagerie TEP, il est

nécessaire de développer des traceurs ayant une haute affinité pour cette protéine. Après des études de relations structure-activité menées par le Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques (LCBPT) de l'Université Paris-Cité, un inhibiteur covalent a été identifié comme ayant une très bonne affinité pour FAK ainsi qu'une excellente sélectivité vis-à-vis d'autres kinases (Figure II.8). En effet, le composé **7f** possède une inhibition de plus de 92% pour la protéine FAK à une dose de 100 nM contre 1,2% pour EGFR, 2,5% pour Akt et 4,1% pour Erk.¹⁰⁵ De plus, le concept d'inhibiteur covalent est prometteur pour développer un radiotraceur pour l'imagerie TEP.²⁰⁸ En effet, le radiotraceur covalent s'accumule sur la protéine sans dissociation, augmentant alors la sensibilité de détection de l'imagerie TEP. En l'occurrence, le composé **7f** possède une fonction acrylamide jouant le rôle d'accepteur de Michaël lui permettant de se lier de façon covalente à la protéine par le biais d'une fonction thiol provenant d'une cystéine par exemple.

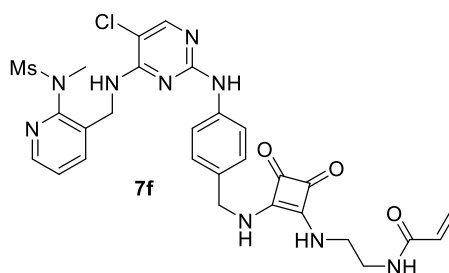


Figure II.8: Structure de l'inhibiteur covalent **7f** développé par le LCBPT

II.2.

Objectifs des travaux

En collaboration avec le LCBPT, le composé **7f** a donc été sélectionné pour développer des radiotraceurs pour l'imagerie TEP de FAK inspirés de sa structure moléculaire. Le composé **7f** possède une position de marquage isotopique au carbone-11 sur la fonction carbonyle du résidu acryloyle, une stratégie qui permet de conserver les propriétés pharmacologiques du composé (Figure II.9a). En parallèle, à cause de la courte demi-vie du carbone-11 qui limite son utilisation élargie, l'objectif est également de développer des analogues fluorés de la molécule **7f** pour un marquage au fluor-18 et envisager des applications plus étendues pour ces traceurs ciblant FAK.

Le composé [¹¹C]**7f** radiomarqué isotopiquement sur la fonction acryloyle peut être obtenu à partir d'un précurseur possédant une amine terminale par réaction de couplage avec l'acide ¹¹C-

acrylique, lui-même obtenu par addition du $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ provenant du cyclotron sur du bromure de vinylmagnésium selon une méthode décrite dans la littérature.⁵⁴ En parallèle, deux radiotraceurs fluorés inspirés du composé **7f** sont envisagés. Le composé $[^{18}\text{F}]\text{Py-FAK}$ possède un atome de fluor sur la position 6 de la pyridine en α de l'azote, une position de marquage favorable pour une $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ à partir d'un précurseur nitro (Figure II.9.b).²⁰⁹ Si la modification de structure du composé **Py-FAK** par rapport au composé **7f** est minimale et ne devrait pas beaucoup altérer les propriétés biologiques de ce dernier, cette approche reste néanmoins un challenge car la synthèse de pyridines trisubstituées est souvent délicate. C'est pourquoi le composé $[^{18}\text{F}]\text{FE-FAK}$ possédant une chaîne aliphatique sur la fonction sulfonamide est également envisagé. Son marquage au fluor-18 serait effectué à partir d'un précurseur portant un groupe partant de type tosylate sur cette position par $\text{S}_{\text{N}}2$ (Figure II.9.b).

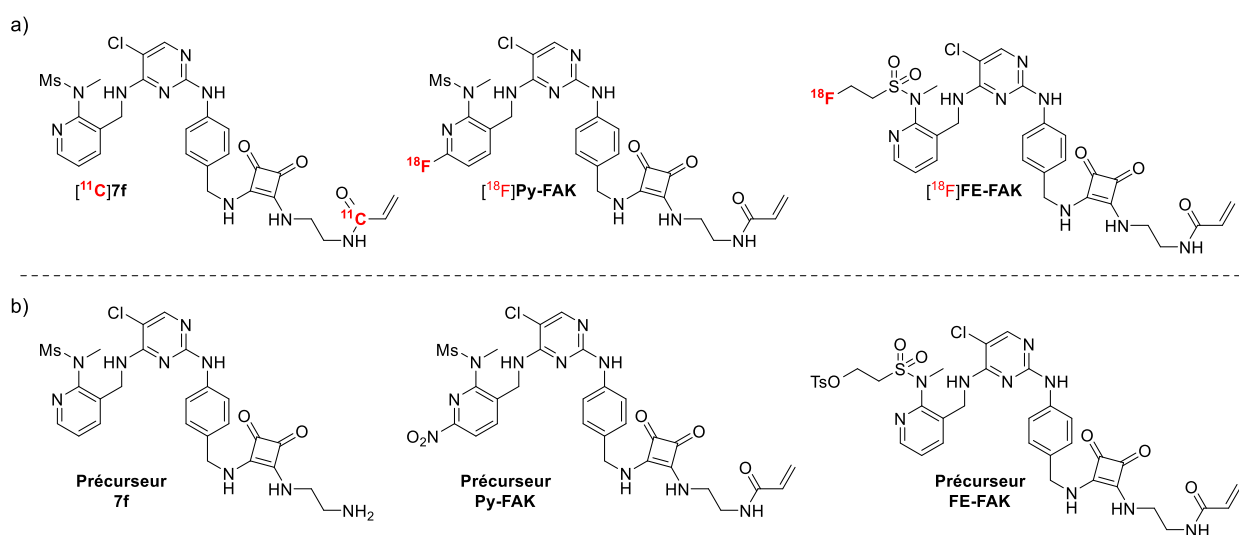


Figure II.9: Objectifs des travaux: développement de radiotraceurs marqués au carbone-11 et fluor-18 pour l'imagerie TEP de FAK. a) Radiotraceurs dérivés de **7f** envisagés ; b) précurseurs de marquage associés

III. Développement du radiotracteur $[^{11}\text{C}]\text{7f}$, analogue isotopique de l'inhibiteur covalent **7f** marqué au carbone-11

*Synthèse du composé **7f** et son précurseur de marquage*

L'objectif ici est d'aboutir à l'obtention du composé **7f** et de son précurseur de marquage selon la synthèse développée au LCBPT.¹⁰⁵ Le composé **7f** peut être obtenu à partir de son précurseur de marquage comportant une amine primaire par réaction avec le chlorure d'acryloyle (Schéma

II.1). Le précurseur de **7f** serait quant à lui obtenu à partir d'un intermédiaire benzylamine par réaction avec un synthon squarate. Cet intermédiaire benzylamine peut être synthétisé par deux alkylations successives avec un synthon pyridine et un synthon aniline sur la 2,4,5-trichloropyrimidine.

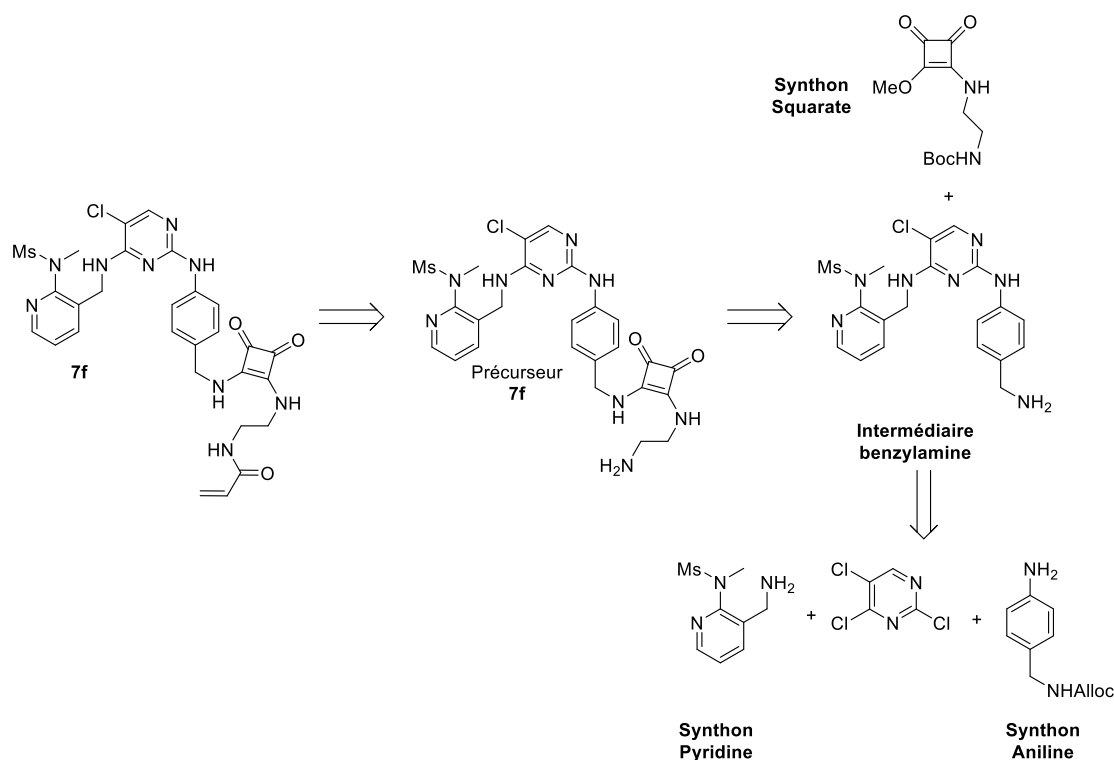


Schéma II.1: Analyse rétrosynthétique du composé **7f** selon la méthode de Li *et al.*¹⁰⁵

En suivant la synthèse décrite par Li *et al.*¹⁰⁵, les trois synthons pyridine, benzylamine et squarate ont été synthétisés au laboratoire.

III.1.1.

Synthon pyridine

Le composé **18** est synthétisé par réaction entre la *N*-méthylamine et le chlorure de mésyle à température ambiante avec un rendement de 26% inférieur à celui décrit par Li *et al.* (77%) qui pourrait être causé par un lot de chlorure de mésyle qui serait partiellement dégradé, ou bien par le fait que la *N*-méthylamine est une solution aqueuse, entraînant une réaction d'hydrolyse du chlorure de mésyle. Le composé **18** réagit ensuite avec le 2-chloronicotinonitrile en présence de carbonate de potassium dans le DMF à 90°C selon un mécanisme de S_NAr pour former le composé **19** avec un rendement de 41% supérieur à celui obtenu par le groupe du LCBPT qui

était de 27 %. Enfin, la fonction nitrile du composé **19** est réduite en présence d'hydrogène et de palladium supporté sur charbon dans une solution d'ammoniaque dans le méthanol à température ambiante. Le synthon pyridine **20** est ainsi obtenu avec un excellent rendement de 95% (Schéma II.2).

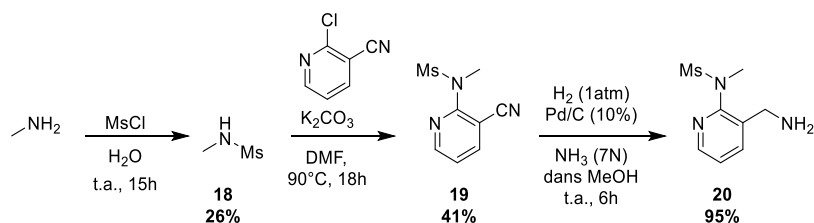


Schéma II.2: Synthèse du synthon pyridine **20**

Synthon aniline

Dans un premier temps, l'amine primaire de la 4-nitrobenzylamine est protégée par du chloroformiate d'allyle en présence de carbonate de potassium dans un mélange équimolaire d'eau et d'acétate d'éthyle pour former le composé **21** avec un rendement de 99%. La fonction nitro du composé **21** est alors réduite en présence de chlorure d'étain au reflux de l'éthanol durant 2h pour aboutir au synthon aniline **22** avec un rendement de 77% (Schéma II.3).

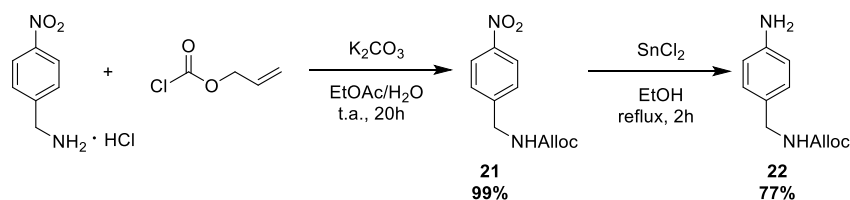


Schéma II.3: Synthèse du synthon aniline **22**

III.1.3.

Synthon squarate

Enfin, le synthon squarate **23** est obtenu en une étape à partir de la *N*-Boc-éthylènediamine commerciale en présence du diméthoxysquarate dans le méthanol à température ambiante, avec un rendement de 60%. La monoalkylation du diméthoxysquarate peut être contrôlée en ajoutant uniquement un équivalent de l'amine de départ (Schéma II.4).²¹⁰

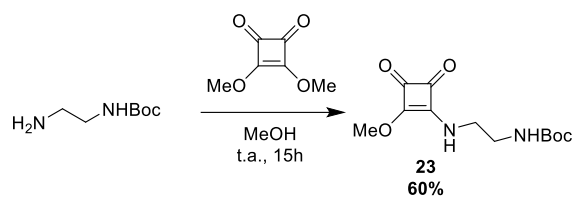


Schéma II.4: Synthèse du synthon squarate **23**

L'assemblage de ces synthons a ensuite été effectué au LCBPT pour aboutir au composé de référence **7f** et à son précurseur de marquage au carbone-11 selon le schéma réactionnel présenté dans le schéma II.5.

La 2,4,5-trichloropyrimidine a été soumise à une réaction de substitution nucléophile régiosécifique sur la position 4 du synthon pyridine **20** pour conduire à un intermédiaire dichloré avec un excellent rendement de 92%. Ensuite, l'atome de chlore en position 2 de la pyrimidine a été substitué par le synthon aniline **22** suivi d'une étape de déprotection du groupement alloc en présence de tétrakis(triphénylphosphine) palladium et de morpholine dans le THF à température ambiante pour conduire à l'intermédiaire benzylamine avec un rendement de 81% sur deux étapes. Une condensation avec le synthon squarate **23** en présence de DIPEA dans le DMF à 75°C suivi d'une déprotection du groupement Boc en présence d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane a permis d'obtenir le précurseur de marquage de **7f** avec un rendement de 58% sur deux étapes. Enfin, le motif acrylate est inséré sur l'amine primaire grâce au chlorure d'acryloyle en présence de DIPEA dans le DMF, conduisant au composé de référence **7f** avec un rendement de global de 3% sur neuf étapes.

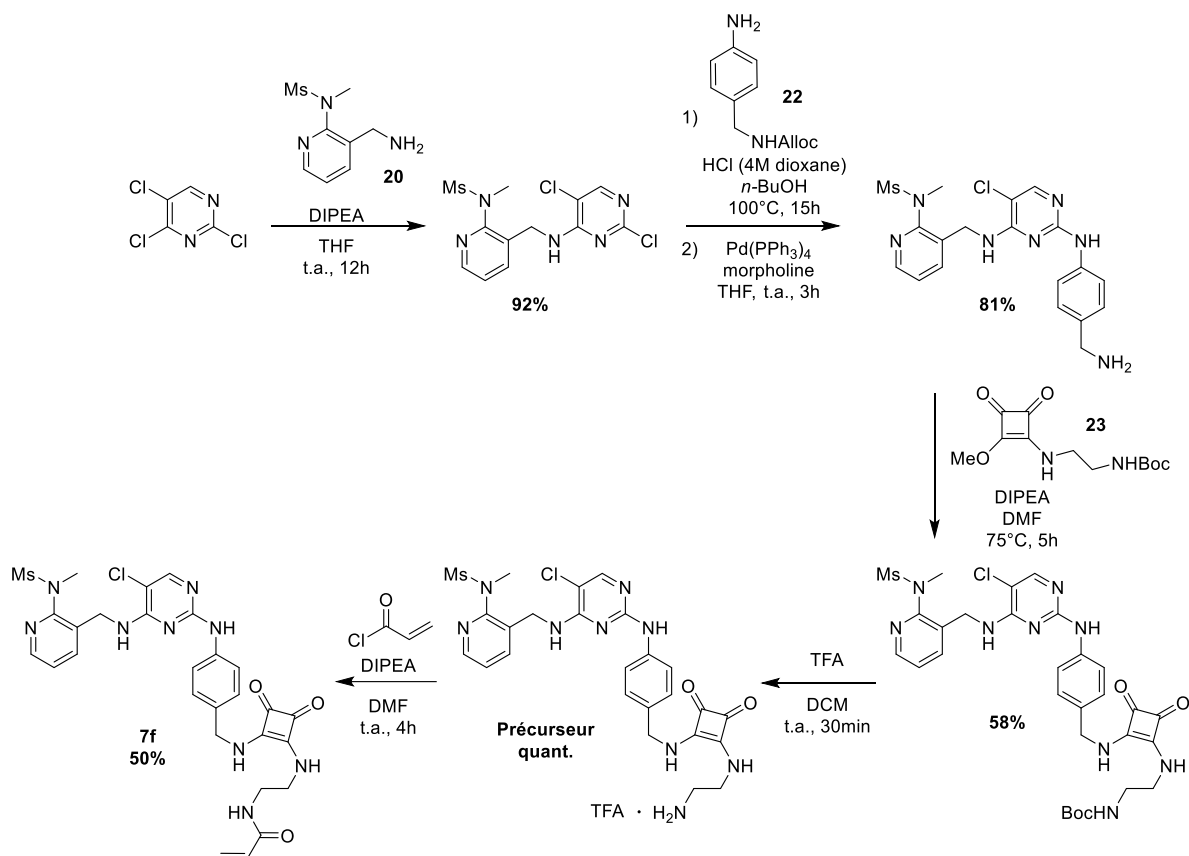


Schéma II.5: Synthèse du composé **7f** réalisée en collaboration avec le LCBPT

La synthèse de ce composé étant assez longue, seules de petites quantités de précurseur (15 mg) et de composé **7f** de référence (7 mg) ont pu être obtenues. Afin de mettre au point les conditions de radiomarquage au carbone-11, la synthèse d'une molécule modèle et de son précurseur de marquage a donc été envisagée (Figure II.10). La molécule modèle choisie possède un groupement benzylamine auquel est attaché le linker squarate avec une chaîne aliphatique portant une amine primaire à son extrémité, position où s'effectuera le marquage au carbone-11 en deux étapes.

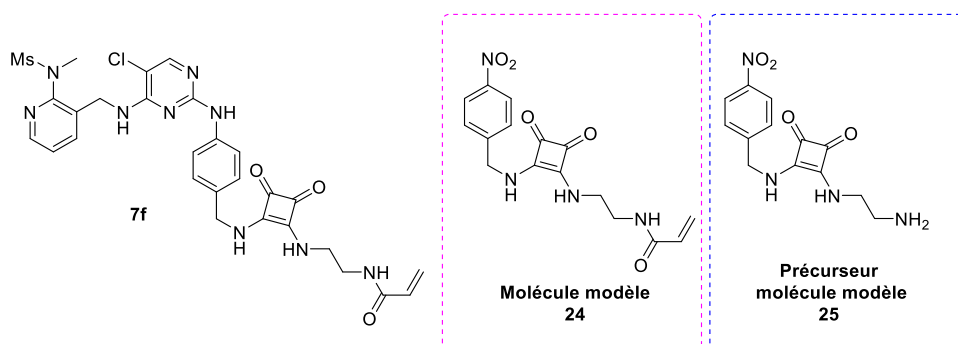


Figure II.10: Structures de la molécule modèle et de son précurseur de marquage basées sur la structure de **7f**

La molécule modèle **24** et son précurseur de marquage **25** ont été synthétisés à partir du synthon squarate **23** précédemment décrit. La réaction de ce dernier avec la 4-nitrobenzylamine en présence de DIPEA à 75°C dans le DMF a conduit au composé **26** qui subit alors une étape de déprotection du groupement Boc et permet d'isoler le précurseur modèle **25** avec un rendement de 76% sur deux étapes. L'amine primaire du composé **25** est acylée en présence de chlorure d'acryloyle et de DIPEA dans le DMF pour conduire au composé modèle **24** avec un rendement de 41% (Schéma II.6). Ce composé servira de référence pour mettre au point les analyses du contrôle qualité.

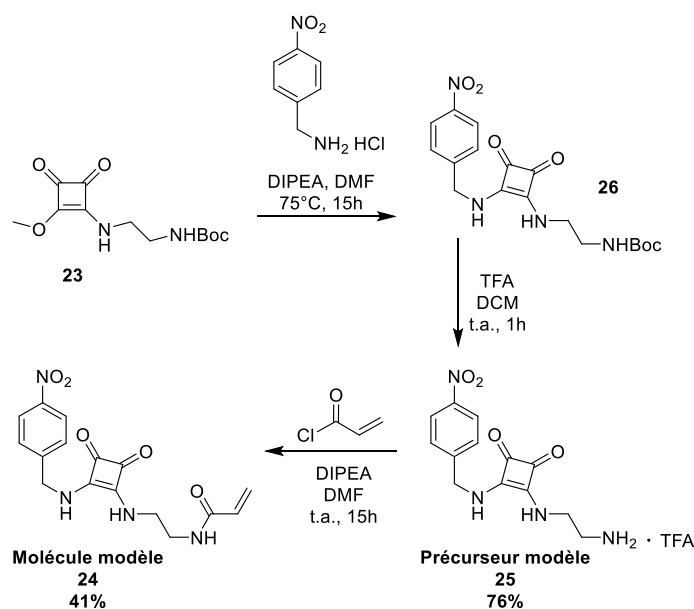


Schéma II.6: Synthèse de la molécule modèle **24** et de son précurseur de marquage au carbone-11 **25**

Radiomarquage isotopique au carbone-11 du composé modèle 24

Dans le but de déterminer les conditions de marquage idéales pour la molécule **7f**, ces dernières ont été mises au point à partir du composé modèle **24** et de son précurseur de marquage **25** sur un automate de synthèse Synthra MeIPlus Research. Il s'agit d'un marquage en deux étapes **III.2** consistant à piéger le $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ du cyclotron par du bromure de vinylmagnésium pour former l'acide acrylique ou le chlorure d'acryloyle marqué au carbone-11 qui est ensuite engagé dans une réaction de couplage avec le précurseur **25** (Schéma II.7). Cette approche a déjà été décrite dans la littérature pour le radiomarquage du $[^{11}\text{C}]\text{Ibrutinib}$.⁵⁴

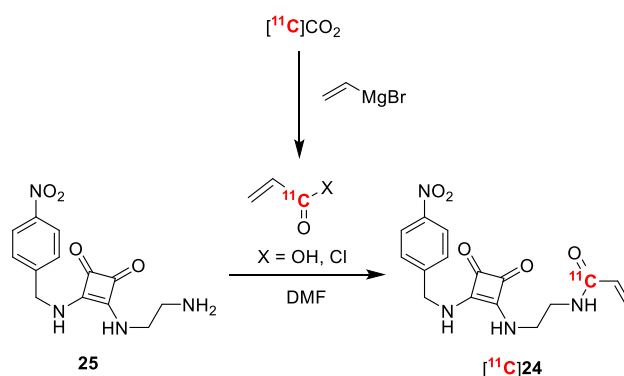


Schéma II.7: Stratégie de radiomarquage du composé modèle **25**

Différentes conditions réactionnelles ont été testées pour la réalisation de ce marquage isotopique et sont présentées dans le tableau II.2. Dans un premier temps, l'acide acrylique marqué au carbone-11 est utilisé comme agent de marquage. Celui-ci est obtenu par réaction du $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ avec le bromure de vinylmagnésium dans le THF, suivie d'une hydrolyse en présence d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique. Les réactions de couplage avec l'amine **25** ont été menées dans le DMF à température ambiante pendant 10 min en présence de différents agents de couplages. L'utilisation de tétrafluoroborate de 2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthylisouronium (TBTU) et de DIPEA comme base n'a pas permis d'observer de produit marqué (Tableau II.2, entrée 1). Le même résultat est observé avec l'utilisation de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) en présence de DMAP (Tableau II.2, entrée 2) ou en présence de 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) et d'EDC (Tableau II.2, entrée 3). Afin d'augmenter la réactivité de l'agent de marquage, l'utilisation d'un chlorure d'acide a été envisagée. Cependant, l'utilisation de chlorure de thionyle ou de chlorure d'oxalyle pour former le chlorure de $[^{11}\text{C}]\text{acryloyle}$ comme agent de marquage avant réaction avec l'amine **25** n'a pas non plus permis de former le radiotraceur

désiré (Tableau II.2, entrées 4 et 5).

Entrée ^a	Agent de marquage	Réactifs	Base	Résultat
1	Acide [¹¹ C]acrylique	TBTU	DIPEA	Pas de marquage
2	Acide [¹¹ C]acrylique	EDC	DMAP	Pas de marquage
3	Acide [¹¹ C]acrylique	EDC-HOBt	-	Pas de marquage
4	Chlorure de [¹¹ C]acryloyle	SOCl ₂	-	Pas de marquage
5	Chlorure de [¹¹ C]acryloyle	Chlorure d'oxalyle	-	Pas de marquage

^aLes réactions ont été réalisées 2 fois

Tableau II.2: Conditions testées pour le marquage du composé modèle **25**

La présence d'eau dans le milieu réactionnel serait une hypothèse quant aux résultats négatifs observés. La formation de l'acide [¹¹C]-acrylique a alors été réalisée en utilisant une solution organique d'acide chlorhydrique dans le 1,4-dioxane, avant de réaliser la réaction de couplage avec l'amine **25** en présence de hexafluorophosphate de (diméthylamino)-*N,N*-diméthyl(3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*b*]pyridin-3-yloxy)méthaniminium (HATU) et de DIPEA dans le DMF durant 10 min à température ambiante (Schéma II.8).

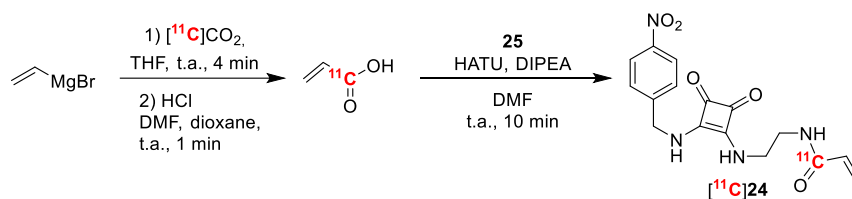


Schéma II.8: Marquage du composé **24**

La conversion de la réaction a été déterminée par radioHPLC par rapport à la quantité de [¹¹C]CO₂ initiale (Figure II.11). Une faible conversion de 11% a pu être mesurée lorsque la réaction de couplage est menée à température ambiante. Une augmentation de la température de réaction à 40 °C ou à 80 °C n'a mené qu'à une diminution drastique de la conversion (1 à 2%). Ces faibles conversions pourraient s'expliquer par la cinétique de la réaction de couplage trop lente par rapport à la demi-vie du carbone-11. La présence d'ions magnésium ou d'ions bromure en très large excès pourrait également interférer avec la réaction de couplage.

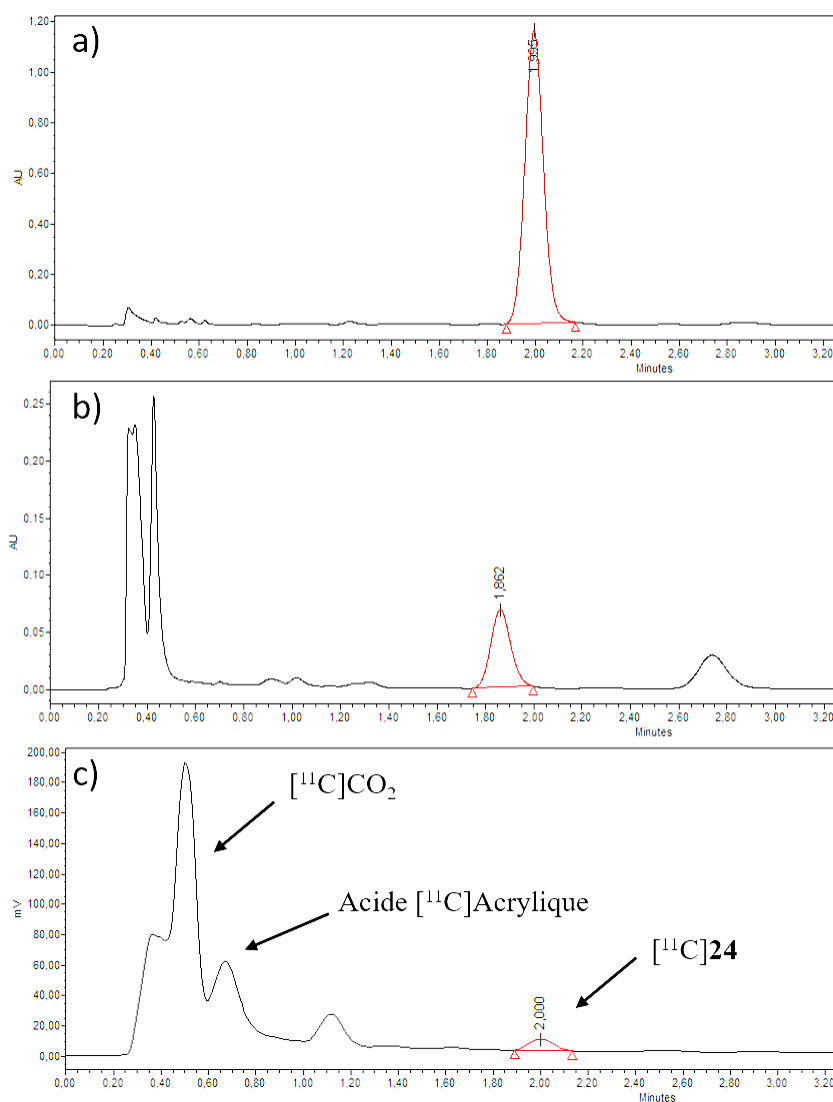


Figure II.11: Contrôle qualité du composé $[^{11}\text{C}]\mathbf{24}$ brut réalisé par HPLC analytique avec détection UV (254 nm) et gamma. a) Chromatogramme UV du composé $\mathbf{24}$ de référence non radioactif b) Chromatogramme UV du composé $[^{11}\text{C}]\mathbf{24}$ c) Chromatogramme gamma du composé $[^{11}\text{C}]\mathbf{24}$

En conclusion, malgré les différentes conditions testées pour le radiomarquage du composé modèle $\mathbf{24}$ au carbone-11, les faibles conversions observées ne permettent pas d'envisager un passage au composé $\mathbf{7f}$ pour des applications en imagerie *in vitro* ou *in vivo*. Le développement d'analogues fluorés de la molécule $\mathbf{7f}$ et leur radiomarquage au fluor-18 ont alors été envisagés.

IV. Développement d'analogues fluorés du composé **7f** et de leurs précurseurs de marquage Synthèse du composé **Py-FAK**

La stratégie générale de synthèse est similaire à celle employée pour la synthèse du composé **7f** étant donné que les modifications de structure ont été réalisées uniquement sur le synthon pyridine de l'inhibiteur. Le composé cible est donc un analogue du synthon **20** comportant un atome de fluor en position 6. La stratégie envisagée ici met en œuvre la réduction d'une fonction nitrile en position 3 pour obtenir la fonction benzylamine de ce nouveau synthon pyridine fluoré. Ce nicotinonitrile pourrait être obtenu par réaction de S_NAr sur un dérivé bromé commercial en présence du composé **18** synthétisé préalablement (Schéma II.9).

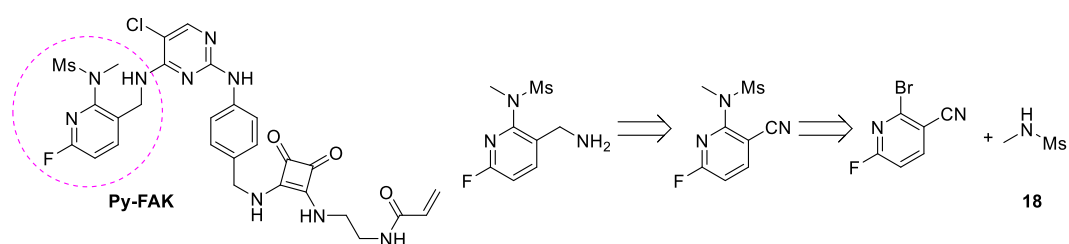


Schéma II.9: Analyse rétrosynthétique du synthon pyridine fluoré permettant d'accéder à l'analogue **Py-FAK**

Ainsi, un essai de S_NAr a été mené entre le 2-bromo-6-fluoro-nicotinonitrile et le composé **18** en présence de carbonate de sodium à 90°C (Schéma II.10). Cependant, aucune trace de la pyridine désirée n'a pu être observée, et le produit de départ a été entièrement récupéré. Ce résultat peut s'expliquer par la faible nucléophilie de la sulfonamide **18** due à la présence du groupement sulfonate électroattracteur.

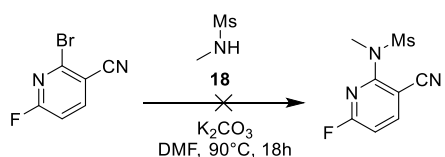


Schéma II.10: Essai de synthèse de la pyridine trisubstituée à partir de la 2-bromo-6-fluoronicotinonitrile commerciale

Une nouvelle stratégie a été envisagée, passant par une réaction de S_NAr entre la méthylamine, plus réactive que la sulfonamide **18**, et le 2-bromo-6-fluoronicotinonitrile. La réaction a été menée dans le THF à température ambiante ou à reflux mais n'a pas permis d'obtenir le composé souhaité (Schéma II.11). Au contraire, deux sous-produits ont été observés. Le

premier, très majoritaire, résulte de la dialkylation sur les deux groupements halogènes. Le deuxième produit observé résulte de la monoalkylation en position 6 préférentiellement, un résultat s'expliquant par la plus grande électronégativité du fluor favorisant l'attaque nucléophile sur sa position.

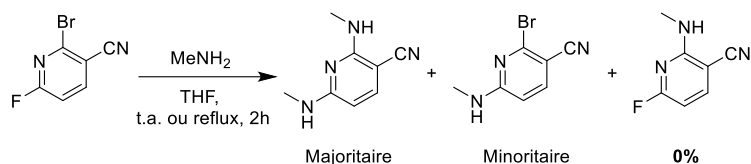


Schéma II.11: Essai de synthèse de la pyridine trisubstituée par S_NAr entre la méthylamine et le 2-bromo-6-fluoronitrile commercial

Ainsi, une nouvelle tentative d'obtention de cette fluoropyridine a été menée. Elle passe par la fonctionnalisation du 2-bromo-6-fluoronitrile de pyridine selon un couplage de Buchwald-Hartwig en présence de méthylamine en solution dans le THF, d'acétate de palladium, de Xantphos ainsi que de carbonate de césium dans le toluène à reflux (Schéma II.12). Ces conditions testées n'ont pas non plus permis d'obtenir le composé souhaité. L'analyse LC-MS montre la formation du produit disubstitué. De plus, une majorité du composé de départ est récupérée.

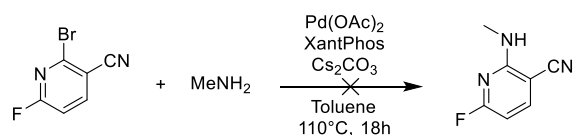


Schéma II.12: Essai de synthèse de la pyridine trisubstituée selon un couplage de Buchwald-Hartwig entre la méthylamine et le 2-bromo-6-fluoronitrile commercial

Devant les difficultés rencontrées pour la synthèse d'un dérivé pyridine trisubstitué, la synthèse d'un autre analogue fluoré **FE-FAK** a été envisagée.

IV.2.

Synthèse du composé **FE-FAK**

La stratégie employée pour le composé **FE-FAK** vise à synthétiser le dérivé pyridine fonctionnalisé avec une chaîne fluoroéthyle par une réduction de la fonction nitrile d'un nicotinonitrile intermédiaire pouvant être obtenu par réaction du chlorure de 2-fluoroéthane-1-sulfonyle avec le 2-méthylaminonitrile (Schéma II.13).

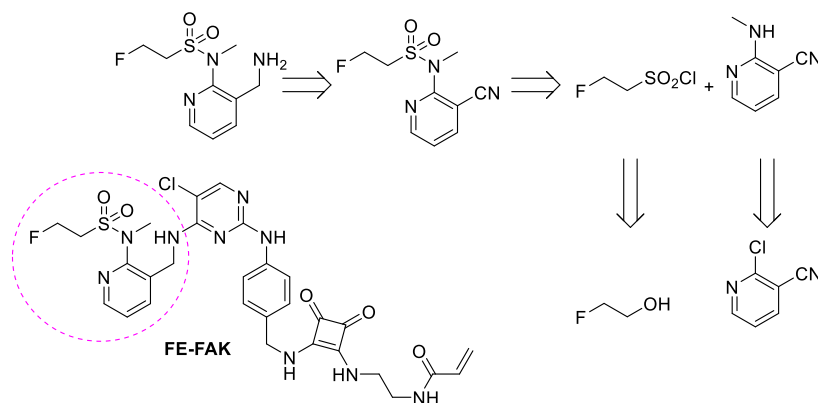


Schéma II.13: Analyse rétrosynthétique conduisant au synthon pyridine fonctionnalisé avec une chaîne fluoroéthyle pour la synthèse de **FE-FAK**

Dans un premier temps, le composé **27** a été obtenu en une étape par réaction du 2-chloronicotinic nitrile avec la *N*-méthylamine dans l'eau à 80°C avec un rendement de 46% (Schéma II.14).

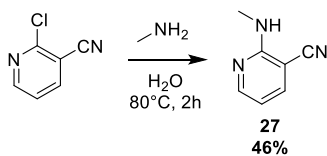


Schéma II.14: Synthèse de la pyridine **27**

En parallèle, la synthèse de la chaîne sulfonyle fluorée a été étudiée. En s'inspirant des travaux de Lengkeek *et al.*²¹¹, la fonction hydroxyle du 2-fluoroéthanol est tosylée en présence de chlorure de tosyloxy, de triéthylamine et de DMAP dans le DCM à température ambiante pour conduire au produit **28** avec un rendement de 99% (Schéma II.15). Ensuite, le composé **28** est alkylé en présence de thioacétate de potassium dans l'acétone à 70°C durant 4h pour obtenir le composé **29** avec un rendement de 78%. Enfin, le thioester **29** est oxydé en présence d'eau oxygénée dans l'acide acétique à 60°C pour former, après traitement par du carbonate de sodium, un sulfonate qui réagit en présence de chlorure de thionyle dans le dichlorométhane à reflux pour conduire au composé **30** avec un rendement de 43%.

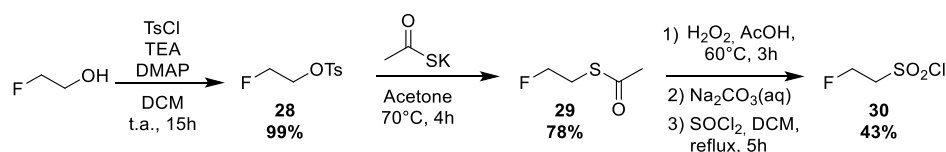


Schéma II.15: Synthèse de la chaîne fluorée **30**

La réaction entre les composés **27** et **30** conduisant au synthon pyridine d'intérêt **31** a alors été étudiée dans différentes conditions réactionnelles (Schéma II.16 et Tableau II.3).

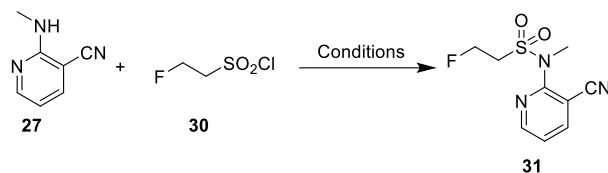


Schéma II.16: Essais de synthèse du synthon pyridine **31**

Dans le DCM à température ambiante en présence de triéthylamine, aucune réaction n'est observée entre les composés **27** et **30** et l'intégralité du synthon pyridine est récupérée (Tableau II.3, entrée 1). Une augmentation de la température de réaction à 50°C ou un changement de solvant pour le DMF ont conduit à la même conclusion (Tableau II.3, entrées 2 et 3 respectivement). Enfin, une tentative d'alkylation de la pyridine en présence d'une base plus forte comme l'hydrure de sodium pour former l'amidure n'a pas permis non plus d'obtenir le produit souhaité et une dégradation de la pyridine de départ a été observée (Tableau II.3, entrée 4). Ce manque de réactivité peut être dû à la présence du groupement nitrile sur le noyau aromatique qui appauvrit le noyau aromatique en électrons, diminuant ainsi la nucléophilie de l'amine. Une autre hypothèse est le manque de stabilité de la chaîne fluorée.

Entrée	Base	Solvant	Température	Observation ^a
1	Et ₃ N	DCM	t.a.	100% 27
2	Et ₃ N	DCM	50°C	100% 27
3	Et ₃ N	DMF	t.a.	100% 27
4	NaH	DCM	t.a.	85% 27 + produit dégradé

^aLes conversions ont été déterminées par LC-MS

Tableau II.3: Conditions testées pour la formation du synthon pyridine **31**

Devant les difficultés rencontrées pour insérer la chaîne fluorée sulfonamide sur le noyau pyridine, un nouvel analogue fluoré a été imaginé.

Synthèse d'un nouvel analogue : le composé PEG-FAK

Compte tenu des résultats précédents, les recherches se sont dirigées vers le composé **PEG-FAK**, analogue de **7f**, portant une chaîne PEG fluorée directement sur l'azote de la fonction aminopyridine (Figure II.12). Le radiotraceur peut être alors obtenu par S_N2 aliphatique à partir

d'un précurseur tosylate.

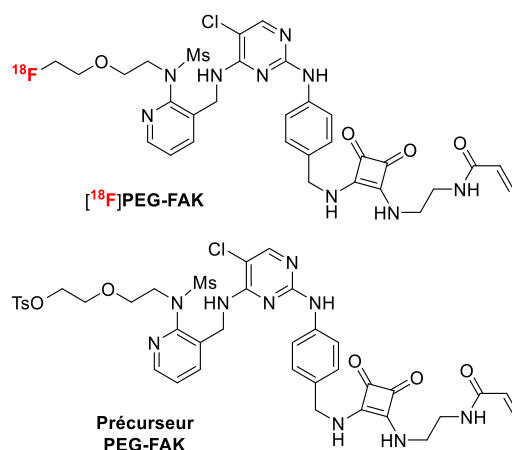


Figure II.12: Nouveau radiotracteur [^{18}F]PEG-FAK envisagé ainsi que précurseur de marquage

Une fois de plus, la stratégie employée est similaire avec dans un premier temps l'obtention d'un synthon pyridine fonctionnalisé. Ce synthon peut être obtenu par réduction de la fonction nitrile d'un dérivé nicotinonitrile, lui-même obtenu par réaction de $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ entre le 2-chloronicotinonitrile et une chaîne PEG fluorée comportant une fonction sulfonamide à son autre extrémité. Cette dernière peut être synthétisée à partir du 2-(2-(2-aminoéthoxy)éthanol) commercial par méthylation des fonctions amine et alcool suivie par une étape de fluoration nucléophile (Schéma II.17).

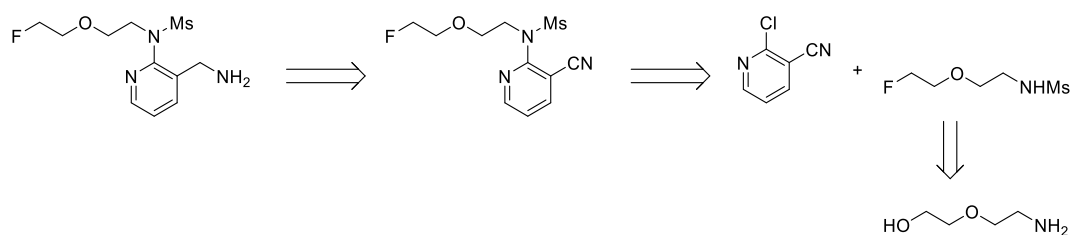
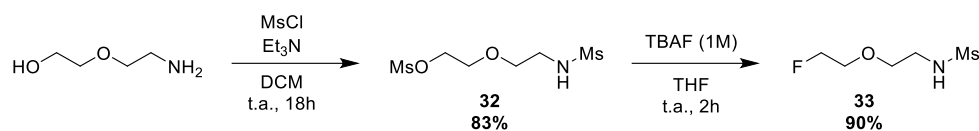
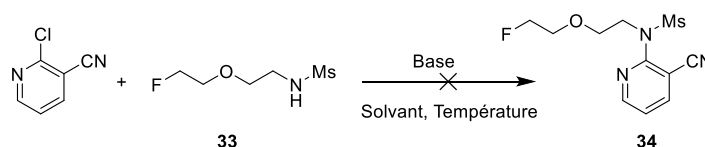


Schéma II.17: Analyse rétrosynthétique conduisant au synthon pyridine du composé PEG-FAK

La synthèse de la chaîne PEG fluorée **33** a été réalisée en deux étapes. Le 2-aminoéthoxyéthanol commercial a été engagé dans une réaction de di-mésylation en présence d'un excès de chlorure de mésyle dans le DCM pour conduire au composé **32** avec un rendement de 83%. Après cela, une étape de fluoration de la fonction mésylate, en présence de TBAF dans le THF à température ambiante, a conduit à la formation du composé **33** avec un bon rendement global de 74% sur deux étapes (Schéma II.18).


Schéma II.18: Synthèse de la chaîne PEG fluorée **33**

Différentes conditions réactionnelles ont alors été testées pour réaliser la réaction de couplage entre le composé **33** et le 2-chloronicotinonitrile (Schéma II.19) dont les résultats sont présentés dans le tableau II.4. Dans les conditions employées pour la synthèse du composé **7f** et décrites par Li *et al.*,¹⁰⁵ en présence de K_2CO_3 dans le DMF, aucune réaction n'est observée (Tableau II.4, entrée 1). L'utilisation de bases plus fortes comme le *tert*-butanolate de potassium ou l'hydrure de sodium ont donné le même résultat (Tableau II.4, entrées 2 et 3 respectivement). Enfin, un essai dans l'acétonitrile à reflux en présence de carbonate de potassium n'a pas non plus permis d'observer le composé désiré (Tableau II.4, entrée 4).


Schéma II.19: Essai de synthèse de la pyridine **34**

Entrée ^a	Solvant	Base	Température	Observations
1	DMF	K_2CO_3	90°C	100% 2-chloronicotinonitrile récupérée
2	DMF	<i>t</i> -BuOK	90°C	100% 2-chloronicotinonitrile récupérée
3	DMF	NaH	90°C	100% 2-chloronicotinonitrile récupérée
4	ACN	K_2CO_3	Reflux	Dégradation des produits de départ

^aLes observations ont été réalisées par analyse LC-MS

Tableau II.4: Conditions testées pour aboutir au composé **34**

Une nouvelle stratégie de synthèse de ce composé **34** a donc été envisagée. Elle passe par la réalisation d'un couplage de Buckwald-Hartwig, en présence de palladium afin d'introduire la chaîne **33** sur la chloropyridine commerciale. Les conditions testées ont été inspirées des travaux existants dans la littérature.²¹² La chaîne fluorée **33** a été mise en réaction avec la 2-chloronicotinonitrile dans le toluène en présence d'acétate de palladium, de carbonate de césium et de XantPhos à 110°C sous atmosphère inerte (Schéma II.20). Cependant, les conditions testées n'ont pas non plus permis d'observer le composé **34** désiré. La nucléophilie du composé **33** n'est peut-être pas suffisante pour réaliser cette réaction de couplage à cause de

la présence du groupement mésylate qui est électroattracteur.

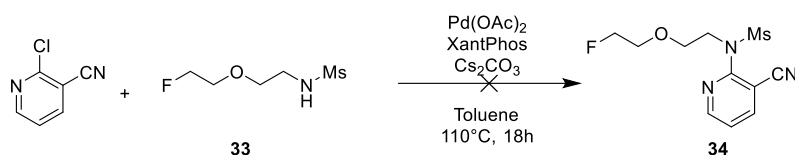


Schéma II.20: Essai de couplage pallado-catalysé de Buchwald pour obtenir le composé **34**

Devant la complexité de synthèse de ces synthons pyridines, il a été envisagé de développer un nouveau traceur, toujours basé sur la structure du composé **7f**, mais comportant un noyau phényle à la place du noyau pyridine. Il a été montré lors des études des relations structures-activités réalisées par le LCBPT que le remplacement d'un noyau pyridine par un noyau phényle avec une fonction amide à la place d'une fonction sulfonamide permettait de conserver les bonnes propriétés d'affinité et de sélectivité pour la protéine FAK. De plus, une modification du nombre de carbone liant le noyau phényle au noyau pyridine est possible. Ainsi, le composé [^{18}F]Ph-FAK a été envisagé (Figure II.13). Il peut également être radiomarqué par $\text{S}_{\text{N}}2$ aliphatique à partir d'un précurseur tosylate. La structure de ce composé est pertinente du fait que le LCBPT a développé un analogue possédant une structure très proche du composé Ph-FAK avec in IC_{50} de 0,6 nM pour FAK.¹⁰⁵

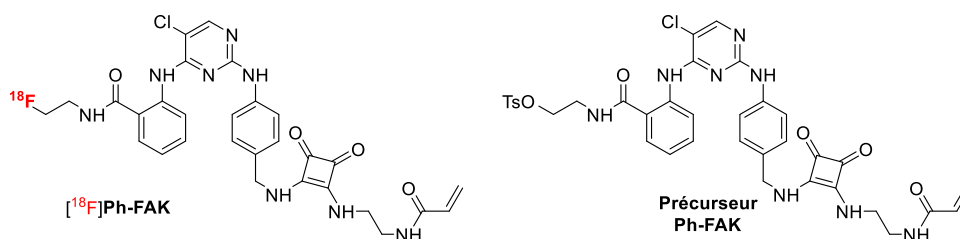


Figure II.13: Structure du traceur [^{18}F]Ph-FAK considéré et de son précurseur de marquage

La stratégie rétrosynthétique pour le composé Ph-FAK consiste en l'obtention d'un intermédiaire comportant une fonction acide carboxylique sur laquelle les chaînes fluorée et tosylate pourraient être greffées par couplage. Cet intermédiaire pourrait être synthétisé en partant de trois synthons, dont deux (**22** et **23**) ont déjà été synthétisés, par condensations successives sur un noyau trichloropyrimidine commercial toujours en s'inspirant de la stratégie de Li *et al.* (Schéma II.21).¹⁰⁵ Le nouveau synthon dichloropyrimidine peut être obtenu par réaction de substitution nucléophile aromatique du 2-aminobenzoate de méthyle sur la 2,4,5-trichloropyrimidine, deux produits commerciaux.

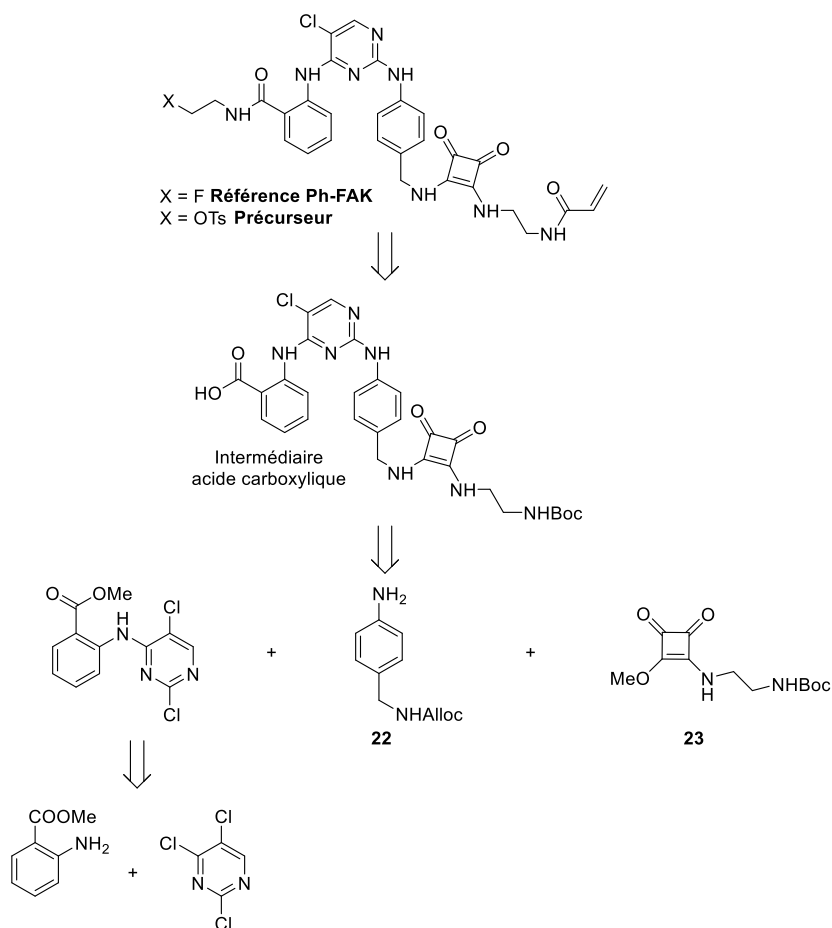


Schéma II.21: Analyse rétrosynthétique conduisant au couple référence/précurseur du composé **Ph-FAK**

La synthèse du composé **Ph-FAK** a été réalisée par Lucas BELIN lors de son stage de Master 2 et sous mon encadrement. Elle débute par la synthèse de la dichloropyrimidine **35** qui a été réalisée par substitution nucléophile aromatique entre le 2-aminobenzoate de méthyle et la 2,4,5-trichloropyrimidine. La réaction a été réalisée en présence d'hydrogénocarbonate de sodium dans le *n*-butanol à 80°C durant 16h pour conduire à l'obtention du composé **35** avec un rendement de 50% (Schéma II.22). Cette réaction est régiosélective, seule la position 4 de la pyrimidine est substituée. Cependant, la réaction n'est pas totale, expliquant le rendement observé dans ces conditions.

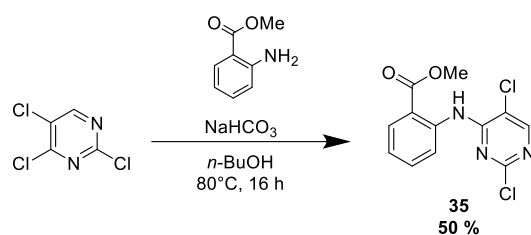


Schéma II.22: Synthèse du synthon dichloropyrimidine **35**

Ensuite, les composés **22** et **35** ont été engagés dans une réaction de substitution nucléophile aromatique dans le *n*-butanol à 100°C durant 16h en présence d'acide chlorhydrique 4 M dans le 1,4-dioxane, conduisant au produit **36** avec un rendement de 57% (Schéma II.23). Inspiré de la synthèse décrite par Li *et al.*¹⁰⁵, la déprotection du groupement alloc a été dans un premier temps réalisée en présence de Pd(PPh₃)₄ et de morpholine. Cependant, il a été difficile de séparer le produit **37** désiré de l'excès de morpholine introduit dans le milieu réactionnel. Il a donc été décidé de remplacer la morpholine par la diéthylamine, permettant de simplifier l'étape de purification. La réaction de déprotection a ainsi été réalisée en présence de Pd(PPh₃)₄ et de diéthylamine dans le THF à température ambiante, permettant l'obtention du composé déprotégé **37** avec un rendement de 70%. Enfin, ce composé **37** a été engagé dans une réaction de substitution avec l'intermédiaire squarate **23** préparé au préalable, en présence de DIPEA dans le DMF à 100°C, aboutissant au composé **38** avec un rendement de 55%.

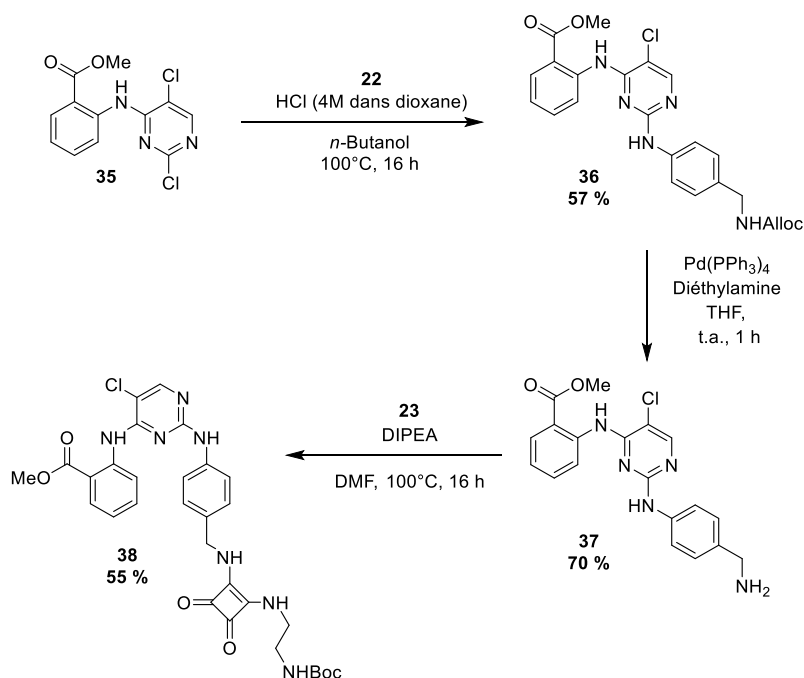


Schéma II.23: Séquence réactionnelle conduisant au composé **38**

Afin d'obtenir l'intermédiaire clé acide carboxylique, la saponification du composé **38** a été réalisée en présence d'une solution aqueuse de soude. Deux produits majoritaires **39a** et **39b** ont alors été détectés, dont les structures sont supposées après analyse LC-MS (Schéma II.24).

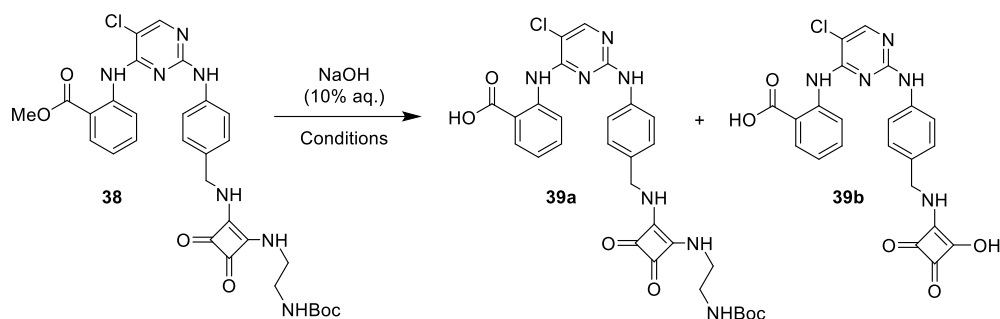


Schéma II.24: Essais de saponification pour la synthèse du composé **39a**

Différentes conditions ont alors été testées pour favoriser la formation du composé **39a** désiré. Ces conditions sont résumées dans le tableau II.5. Lorsque la réaction est menée à reflux dans un mélange équimolaire d'eau et de 1,4-dioxane, seul le composé **39b** est détecté (Tableau II.5, entrée 1). Il en va de même lorsque la réaction est réalisée à 40°C (Tableau II.5, entrée 2). A température ambiante dans un mélange eau/1,4-dioxane ou dans le méthanol (Tableau II.5, entrées 3 et 4 respectivement), la formation du composé **39b** n'est pas observée mais la conversion en composé **39a** reste faible et une grande partie du réactif de départ n'est pas solubilisée.

Entrée	Conditions	39a ^a	39b ^a
1	H ₂ O/1,4-dioxane, reflux, 1 h	-	100 %
2	H ₂ O/1,4-dioxane, 40°C, 1 h	4 %	91 %
3	H ₂ O/1,4-dioxane, t.a., 21 h	24 %	-
4	Méthanol, t.a., 21 h	19 %	-

^aLes proportions des composés ont été déterminées par LC-MS

Tableau II.5: Conditions testées pour la saponification du composé **38**

Le motif squarate n'étant pas stable en milieu basique et la conversion de la réaction étant trop faible, une nouvelle stratégie de synthèse a été envisagée, introduisant ce motif sensible en fin de séquence réactionnelle (Schéma II.25). Elle passe donc par la réalisation de l'étape de saponification et de couplage sur l'acide carboxylique de la chaîne fluorée pour la référence ou de la chaîne hydroxyéthylamine protégée pour le précurseur de marquage avant l'étape de condensation du motif squarate. Cette saponification peut alors être réalisée sur le composé **36** préalablement synthétisé.

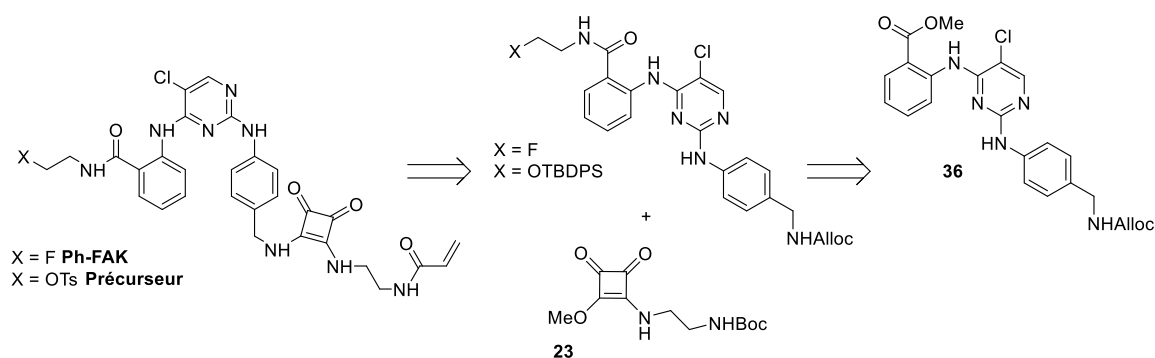


Schéma II.25: Nouvelle stratégie envisagée pour la synthèse du couple référence/précurseur du composé **Ph-FAK**

Le composé **36** synthétisé au préalable a été engagé dans une réaction de saponification en présence de soude dans un mélange équimoléculaire composé de 1,4-dioxane et d'eau à 50°C pour aboutir à l'acide carboxylique **40** avec un rendement de 70% (Schéma II.26). Cette réaction n'a pas été menée à température ambiante à cause de la faible solubilité du composé de départ dans le système de solvants.

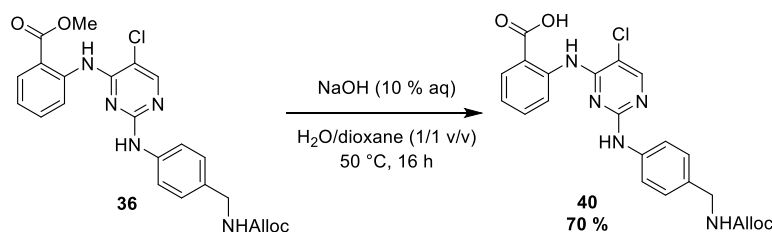


Schéma II.26: Synthèse de l'acide carboxylique **40**

Dans le but d'obtenir un précurseur de marquage possédant une fonction tosylate, une chaîne hydroxyéthylamine doit être greffée. Cependant, la fonction tosylate étant trop labile pour être introduite en cours de synthèse, le choix d'une fonction hydroxyle protégée par un groupement silyl, orthogonal aux groupements Alloc et Boc, a été fait. Ainsi, le composé **41** a été synthétisé à partir du 2-aminoéthanol avec un rendement de 99% en présence de chlorure de *tert*-butyldiphénylsilyle (TBDPSCI) et d'imidazole dans le DCM selon les conditions décrites dans la littérature (Schéma II.27).²¹³

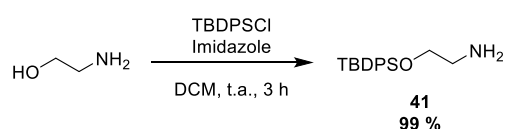


Schéma II.27: Synthèse du composé **41**

Ainsi, l'acide carboxylique **40** a été mis en réaction de couplage soit avec la 2-fluoroéthanamine commerciale soit avec le composé **41** en présence de HATU et de DIPEA dans le DMF à 40°C (Schéma II.28).

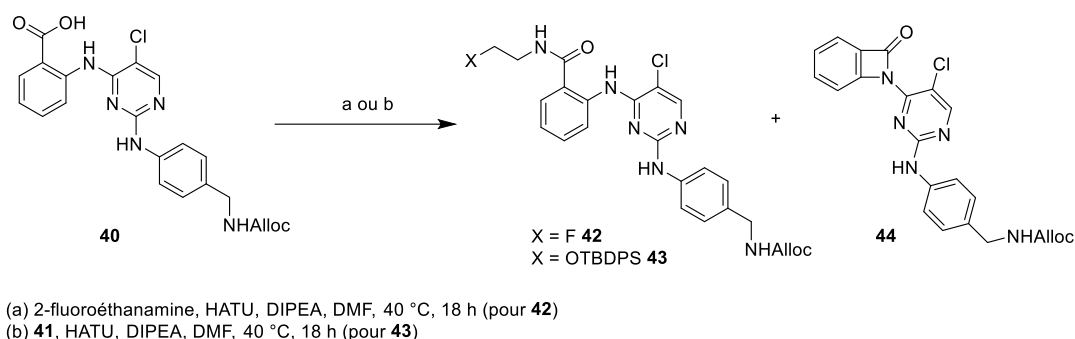


Schéma II.28: Réaction de couplage à partir de l'acide carboxylique **40** en présence des chaînes 2-fluoroéthanamine ou **41**.

Dans ces conditions, la formation d'un même produit secondaire a été observée au cours des deux réactions. L'analyse LC-MS de ce composé indiquerait la formation du lactame **44** résultant d'une réaction de couplage intramoléculaire entre la fonction acide carboxylique et l'amine en position *ortho* de celui-ci. Ce type de cyclisation a déjà été observé par d'autres équipes pour des acides carboxyliques en *ortho* d'une amine, en seulement quelques heures à température ambiante en présence d'un agent de couplage.²¹⁴

Afin de confirmer la structure du composé **44**, des analyses RMN ¹H et ¹³C ont été réalisées. En RMN du proton, deux singulets correspondants aux protons de l'acide carboxylique et de l'amine en *ortho* disparaissent sur le spectre du composé **44** par rapport au spectre de l'acide carboxylique **40** de départ (Figures II.14 a) et b)). En RMN du carbone-13, le signal correspondant au carbone de l'acide carboxylique du composé **40** de départ ($\delta = 169,9$ ppm) apparaît plus blindé ($\delta = 164,2$ ppm) pour le composé **44**, indiquant une modification de son environnement chimique.

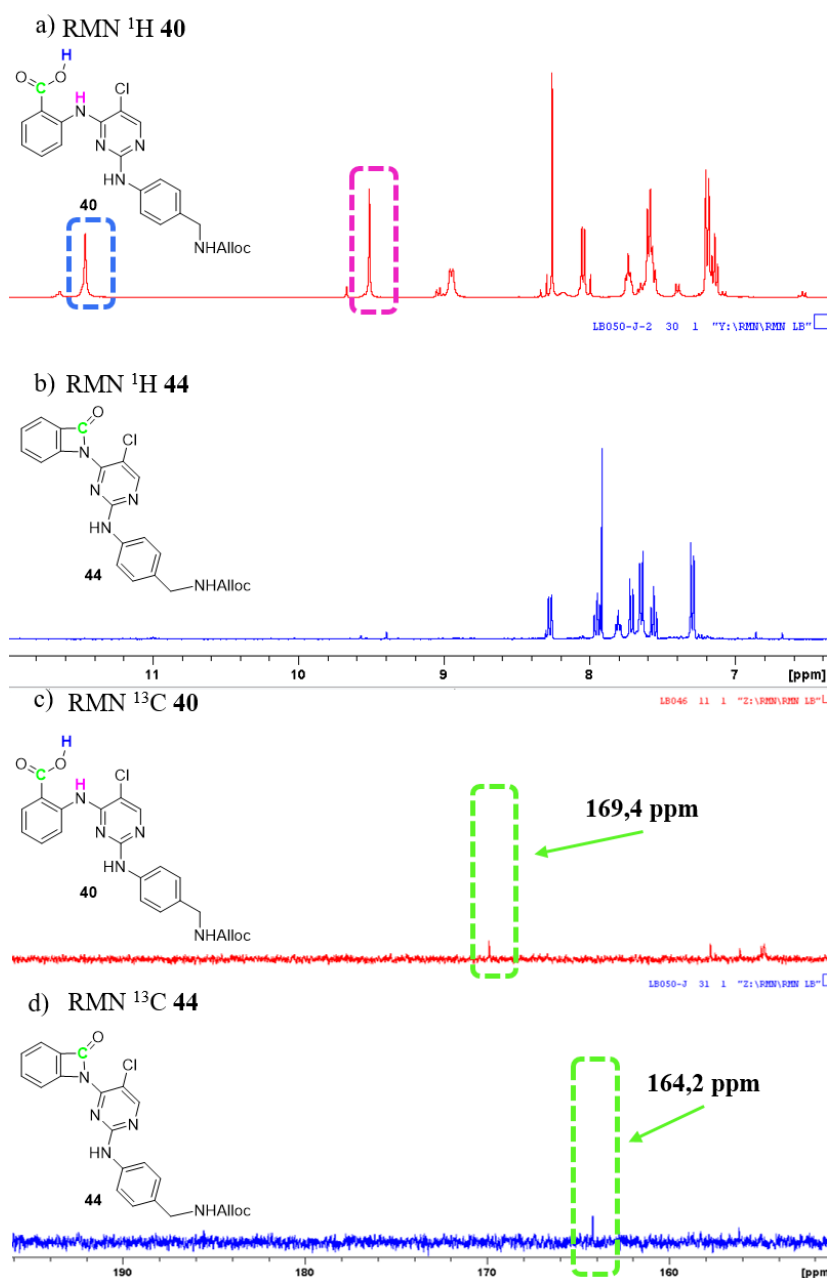


Figure II.14: Spectres RMN des composés **40** et **44** zoomés sur les zones d'intérêts. a) Spectre RMN ^1H du composé **40** b) Spectre RMN ^1H du composé **44** c) Spectre RMN ^{13}C du composé **40** d) Spectre RMN ^{13}C du composé **44**

En tenant compte de l'identification du sous-produit formé, le couplage entre l'acide carboxylique **40** et la 2-fluoroéthanamine a été optimisé. L'utilisation d'un excès d'amine (2 équivalents) a permis de limiter la formation du sous-produit **44** et d'obtenir le produit **42** désiré avec un rendement de 47%. Ensuite, le composé **42** a été déprotégé en présence de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ et de diéthylamine dans le THF durant 4h pour donner le composé **45** avec un rendement de 57% (Schéma II.29).

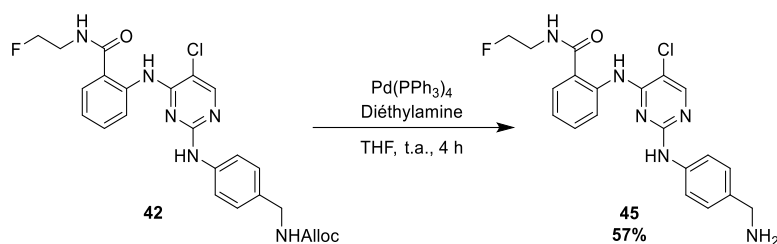


Schéma II.29: Déprotection du composé **42**

Le composé **45** ainsi formé est condensé avec le dérivé squarate **23** précédemment synthétisé en présence de DIPEA dans le DMF à 100°C pour conduire au composé **46** avec un rendement de 59% (Schéma II.30). Le groupement Boc est ensuite clivé en présence de TFA dans le DCM à température ambiante pour aboutir quantitativement à l'amine primaire **47**. Enfin, la séquence réactionnelle qui est encore en cours de réalisation consisterait à brancher le motif acrylate sur l'amine primaire **47** pour conduire à la référence **Ph-FAK** (Schéma II.30).

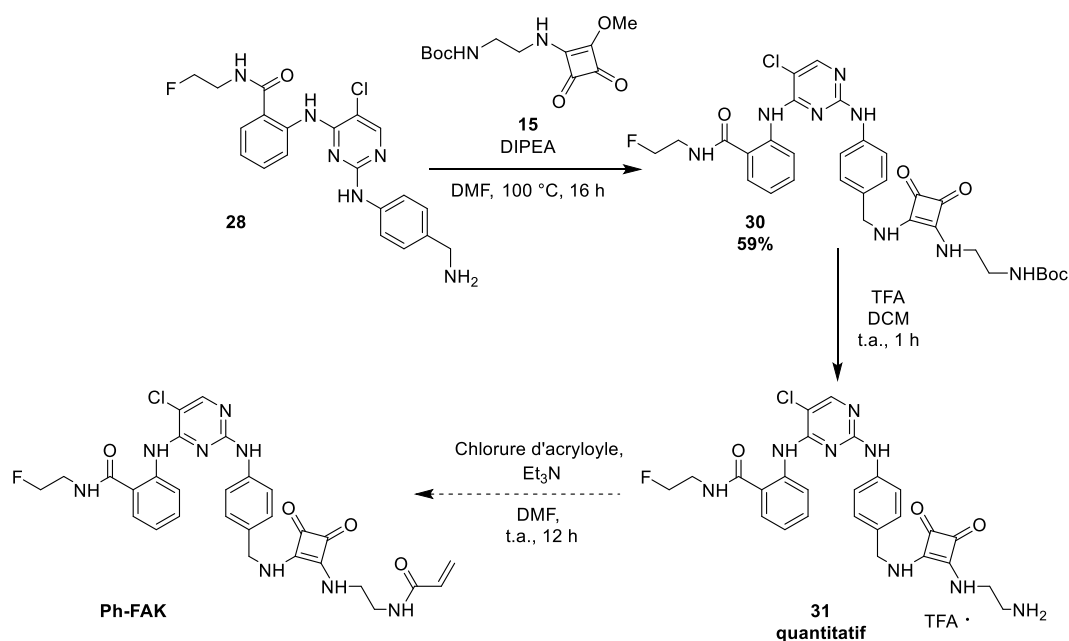


Schéma II.30: Séquence réactionnelle en cours pour l'obtention du composé **Ph-FAK**

En parallèle, la synthèse du précurseur de marquage du composé **Ph-FAK** a été initiée (Schéma II.31). Elle passe par le couplage de l'amine **41** sur l'acide **40** en présence de HATU et de DIPEA dans le DMF à 40°C pour conduire au composé **43** avec un rendement de 81%. Le groupement Alloc du composé est alors clivé en présence de Pd(PPh₃)₄ et de diéthylamine dans le THF pour conduire à l'amine primaire **48** avec un rendement de 51%. Ce composé est ensuite

mis en réaction avec l'intermédiaire squarate **23** pour conduire au composé **49** avec un rendement de 52% (Schéma II.31).

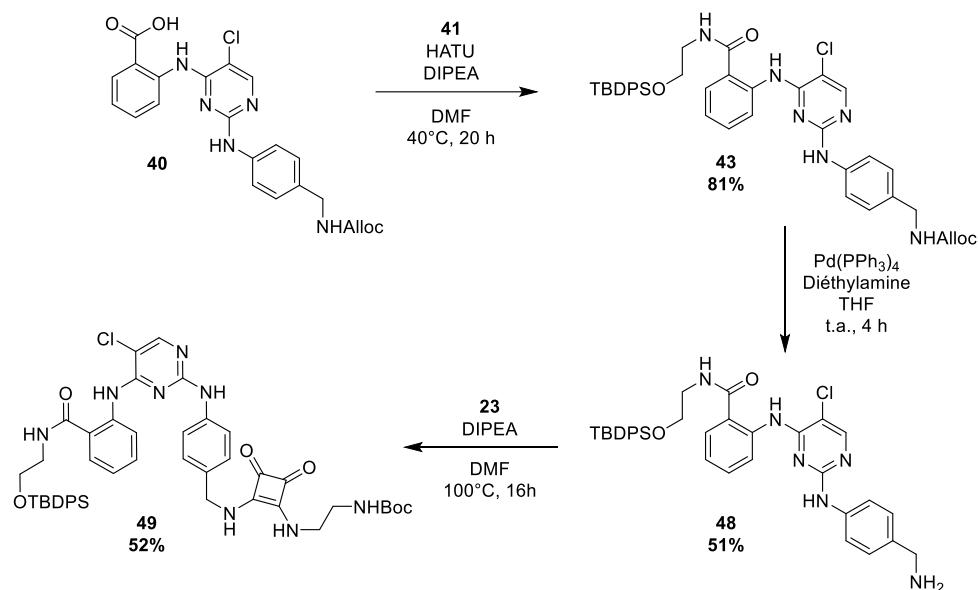


Schéma II.31: Synthèse en trois étapes du composé **49** à partir de l'acide **40**

En s'inspirant de la synthèse de la référence fluorée **Ph-FAK**, la suite de la synthèse envisagée passerait par la déprotection du groupement Boc, puis comme précédemment par la condensation du motif acrylate sur l'amine primaire formée. Ensuite, la stratégie imaginée consisterait en la déprotection du groupement silylé suivie de l'activation de l'alcool libéré sous forme de tosylate pour aboutir le précurseur de marquage du composé **Ph-FAK** (Schéma II.32).

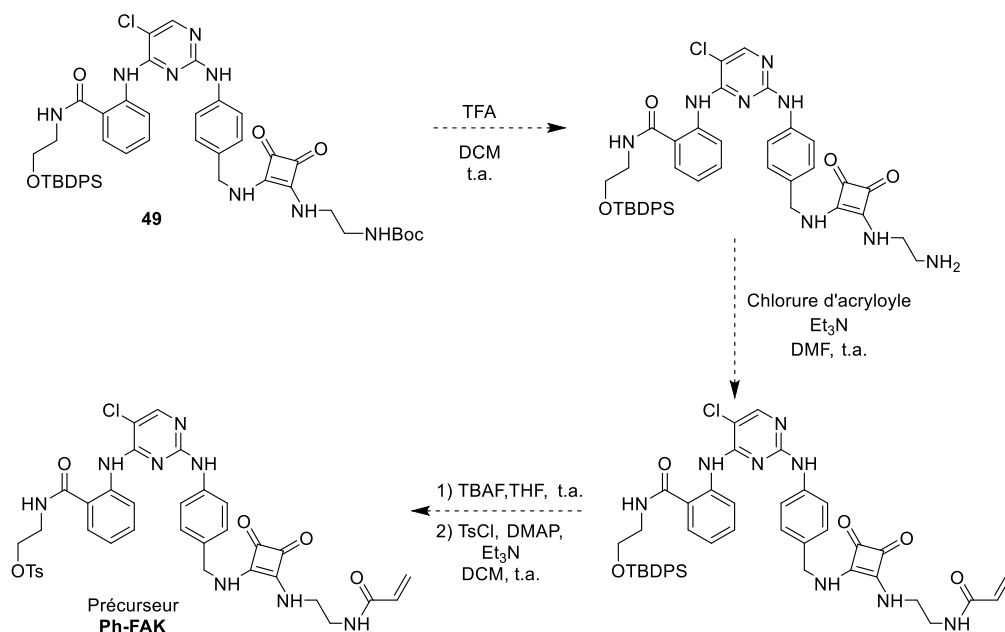


Schéma II.32: Synthèse envisagée pour conduire au précurseur de marquage de **Ph-FAK** à partir de **49**

V. Conclusions et perspectives

Détecter la présence de la surexpression de la protéine FAK en oncologie permettrait de quantifier le degré d'agressivité d'une tumeur pour pouvoir orienter les traitements. Dans ce contexte, le composé **7f** a été identifié par le LCBPT comme inhibiteur covalent de FAK possédant des propriétés d'inhibition intéressantes ainsi qu'une bonne sélectivité vis-à-vis de la cible choisie. Cette molécule ainsi que son précurseur de marquage ont été synthétisés avec des rendements de 3% et 5% en neuf et huit étapes respectivement. Le marquage isotopique au carbone-11 de cette structure étant original, un composé modèle a été développé afin de mettre au point les conditions de radiocarbonylation mais cette étude n'a pas permis d'obtenir le traceur avec des résultats satisfaisants. C'est pourquoi en parallèle, trois analogues fluorés de **7f** ont été envisagés. La synthèse de ce type de composé s'est avérée complexe, et n'a pas conduit à l'obtention des composés fluorés désirés. Alors, un nouvel analogue, **Ph-FAK** a été imaginé et sa synthèse ainsi que celle de son précurseur de marquage sont encore en cours de développement avec des résultats préliminaires encourageants. Une évaluation de l'affinité du composé **Ph-FAK** pour la protéine sera réalisée avant le développement d'une méthode de marquage au fluor-18 et une évaluation *in vitro* et *in vivo* du radiotraceur.

CHAPITRE III :
DÉVELOPPEMENT DE
RADIOTRACEURS POUR
L'IMAGERIE TEP DE LA PROTÉINE
SPHINGOSINE KINASE 1

I. La sphingosine kinase 1 : un biomarqueur oncologique

I.1. Présentation de la sphingosine kinase 1

La sphingosine kinase est une enzyme qui a pour rôle de catalyser la phosphorylation de la sphingosine, un lipide essentiel du métabolisme des sphingolipides, en sphingosine-1-phosphate (S1P). La sphingosine kinase est présente dans un grand nombre d'espèces avec une très forte conservation de sa séquence d'acides aminés.²¹⁵ Elle se décline en deux isoformes, SK1 et SK2, dont les gènes codant se situent sur les chromosomes 17 et 19 respectivement. SK1 a été mise en évidence pour la première fois dans les années 1970 dans le foie de rat, le cerveau de bœuf ou encore dans les plaquettes humaines.²¹⁶ Cette protéine est ubiquitaire, l'ARN messager codant pour SK1 étant retrouvé dans le poumon, la rate, le cœur ou encore le cerveau.²¹⁷ Cette kinase de 42,5 kDa possède cinq domaines nommés C1 à C5. Les domaines C1 à C3 constituent le domaine catalytique, le domaine C2 représentant le site de liaison à l'ATP. Le domaine C4 permet la fixation de la sphingosine sur l'enzyme et le domaine C5 est impliqué dans le transfert du groupement phosphate. Même si cette protéine est majoritairement cytoplasmique, elle peut se retrouver à la membrane plasmique du fait de différents stimuli ou stress cellulaires.²¹⁸

I.2.

Voies de signalisation cellulaire et fonctions biologiques

SK1 est donc une enzyme impliquée dans le métabolisme des sphingolipides, un ensemble de lipides participant à la structure des membranes cellulaires et jouant un rôle dans de nombreux processus biologiques.²¹⁹ De nombreux activateurs de cette protéine ont été décrits tels que des facteurs de croissance, des ligands de récepteurs couplés aux protéines G ou encore des ions présents dans le milieu intracellulaire. Participant à cette voie de signalisation sphingolipidique, céramide, sphingosine et S1P sont des lipides bioactifs considérés comme des acteurs majeurs de nombreux processus biologiques. En effet, il a été montré que ces trois lipides jouaient un rôle dans la survie cellulaire, la prolifération, la migration, la réponse immunitaire, l'angiogénèse ou encore dans différentes pathologies telles que le cancer ou les maladies cardiovasculaires.^{215,220} SK1 est l'une des enzymes clé permettant de contrôler l'équilibre entre ces sphingolipides (Schéma III.1). On parle alors de biostat sphingolipidique, le céramide et la sphingosine étant des messagers impliqués dans l'apoptose et bloquant la prolifération cellulaire, alors que la S1P, *via* son interaction avec des RCPG (S1PXR, X = 1-5) participe à la

survie cellulaire, la migration ou encore à la régulation du système immunitaire.^{221,222}

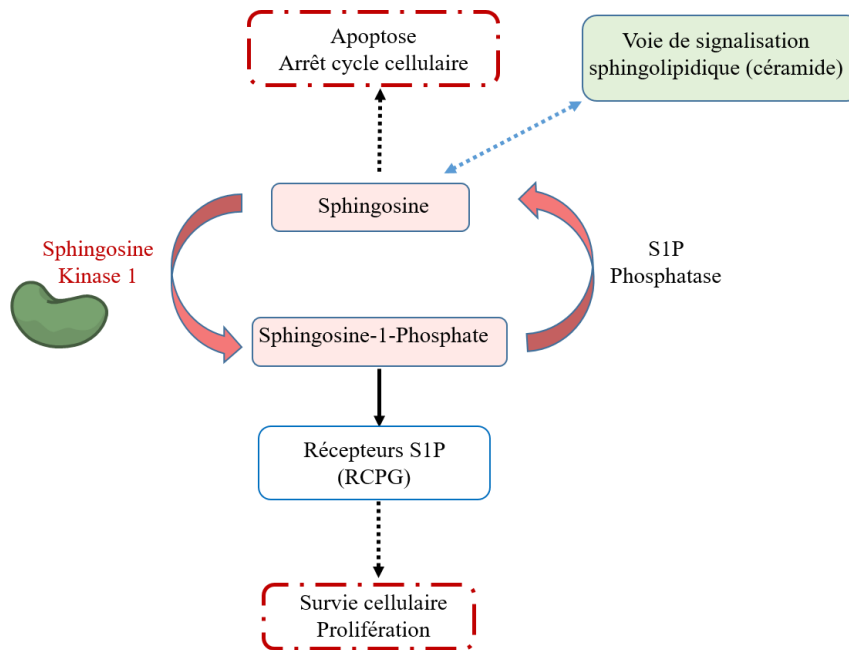


Schéma III.1 : Biostat sphingolipidique régulé par SK1 et S1P phosphatase

I.3. Implication de SK1 dans la cancérogénèse

Du fait de sa localisation au centre d'une voie de signalisation cellulaire et de son implication dans de nombreux processus biologiques, S1P et donc SK1 peuvent être impliquées dans la cancérogénèse. En effet, l'expression de SK1 affecte l'équilibre entre les sphingolipides pro-apoptotiques et anti-apoptotiques déterminant ainsi le devenir cellulaire.

Il a été montré que le niveau d'expression de SK1 était plus élevé dans les tissus tumoraux que dans les tissus sains chez des patients atteints de cancer du côlon.²²³ De plus, on observe dans certains cas de cancers du sein que le niveau d'expression de l'ARNm codant pour SK1 est quatre fois plus important que chez des patients sains.²²⁴ Enfin, la surexpression de SK1 est corrélée avec un mauvais pronostic.²²⁵ En effet, chez des patients atteints de glioblastome, l'augmentation de la concentration en protéine SK1 est liée à une diminution de la survie des patients.²²⁶ Le groupe de Xia *et al.*²²⁷ a observé que la surexpression de la protéine dans des fibroblastes entraîne la transformation des cellules qui deviennent capables de former des tumeurs dans des modèles murins, démontrant ainsi le caractère oncogène de SK1. Cette approche a été confortée par Pchejetski et ses collègues grâce à l'injection chez la souris de cellules tumorales de cancer de la prostate surexprimant SK1 qui possèdent une progression

tumorale plus importante que lors de l'injection de cellules tumorales contrôles n'exprimant pas SK1.²²⁸

Plusieurs études ont également montré que la surexpression de SK1 était corrélée avec le blocage des processus d'apoptose et la résistance aux traitements de chimiothérapie.^{229,230} Par exemple, les cellules HL-60 de leucémie présentant une surexpression de SK1 sont protégées de l'apoptose induite par la doxorubicine.²³¹

En résumé, la surexpression de la protéine SK1 dans de nombreux types de cancers favorise la croissance tumorale, la chimiorésistance et en fait un facteur de mauvais pronostic. C'est pourquoi cette protéine a été étudiée comme potentielle cible thérapeutique.

Thérapies ciblant SK1 et S1P1R

I.4.

Du fait de sa position centrale au sein de la voie de signalisation sphingolipidique, l'inhibition de SK1 constitue un traitement efficace contre le cancer en diminuant la production de S1P, oncogène impliqué la prolifération et la migration des cellules tumorales. De plus, l'inhibition de SK1 ne permet pas seulement de réduire la production de S1P mais également d'augmenter la production de sphingosine et donc de céramide, promoteurs de l'apoptose, en jouant sur le biostat sphingolipidique.²³² Ainsi, de nombreux inhibiteurs de SK1 ont été développés comme stratégie anticancéreuse, non sans complexité du fait de l'ubiquité de SK1. La découverte de la structure cristalline de la protéine a permis d'orienter la conception d'inhibiteurs de SK1 en se basant sur la structure de la sphingosine, son ligand naturel (Figure III.1). Le groupe de Jendiroba *et al.* a montré le potentiel d'inhibition du composé *N,N*-diméthylsphingosine ($K_i = 3,1 \mu\text{M}$) sur des cellules de leucémie, conduisant à leur apoptose.²³³ Le Safingol, utilisé pour l'inhibition de SK1, permet quant à lui d'augmenter la concentration en céramide, induisant alors la mort cellulaire sur des cellules CT-116 du cancer du côlon.²³⁴ Ces deux composés ont été développés jusqu'à la phase I. Le composé FTY720, aussi appelé Fingolimod, possède quant à lui une autorisation de mise sur le marché pour son rôle d'antagoniste des récepteurs S1P1 permettant d'activer des lymphocytes dans un contexte de neuroinflammation.²³⁵ Ce composé est alors phosphorylé et interagit avec les récepteurs de S1P pour lutter contre la sclérose en plaques et possède un IC_{50} de 173 nM.

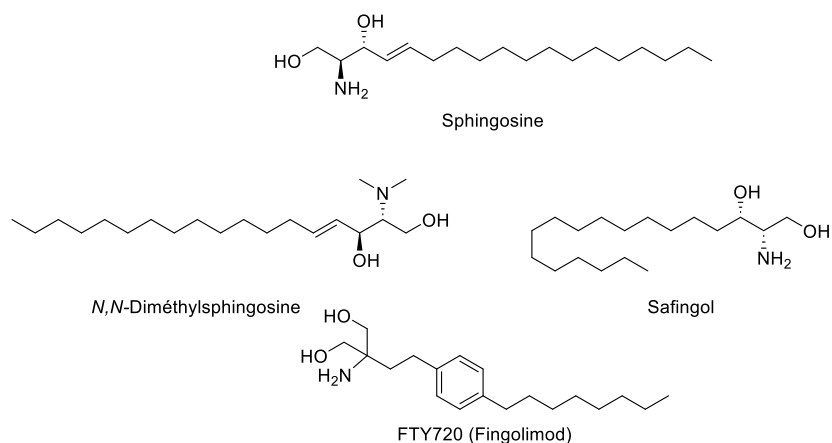


Figure III.1: Structure de la sphingosine et de la première génération d'inhibiteurs de SK1 développés²³⁶

L'inconvénient de cette première génération d'inhibiteurs est sa non sélectivité entre les deux isoformes de la kinase, SK1 et SK2. C'est pourquoi l'inhibiteur SK1-1, sélectif de SK1a été développé en 2008 par le groupe de Paugh *et al.* (Figure III.2).²³⁷ Cet inhibiteur possède une constante d'inhibition pour SK1 de l'ordre de la dizaine de μM . Il permet de réduire le niveau de S1P *in vivo* dans un modèle murin de cancer du sein, stimule l'apoptose et réduit l'angiogénèse.²³⁸ Par la suite, d'autres familles de composés ont été développées, toutes gardant dans leur structure une fonction polaire de type amidine, guanidine ou pyrrolidin-2-ylméthanol ainsi qu'une partie hydrophobe composée de cycles aromatiques et/ou d'une longue chaîne aliphatique sur le modèle de la sphingosine, le ligand naturel.²³⁸ A titre d'exemple, le composé PF-543 est le plus efficace et sélectif à ce jour pour l'inhibition de SK1.²³⁸ Il se lie à la protéine sur le même lieu de fixation que le ligand naturel et réduit le niveau de S1P sur des cellules du carcinome humain.²³⁹

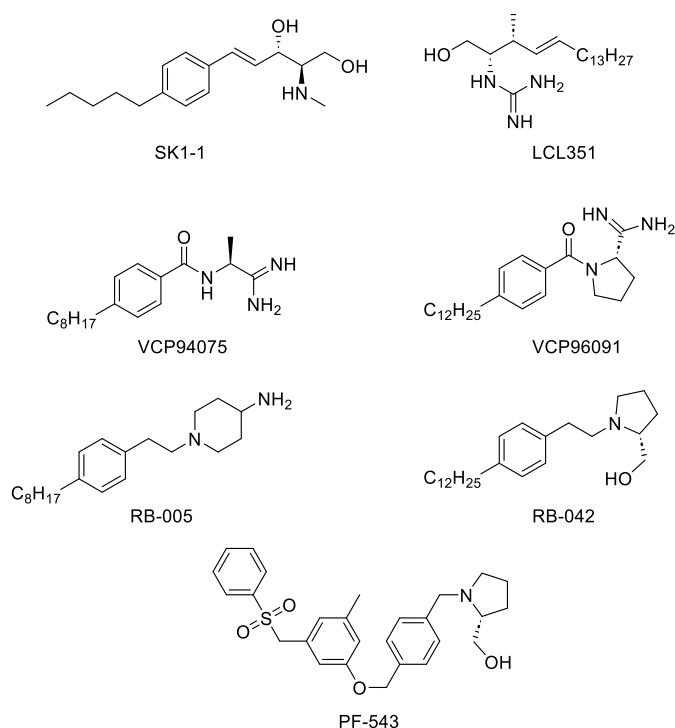


Figure III.2: Série d'inhibiteurs sélectifs de SK1

1.5. Imagerie de SK1

La surexpression tumorale de SK1 est un biomarqueur de prolifération et de résistance aux traitements conventionnels. Il est donc important de développer des agents d'imagerie capables d'évaluer la surexpression de SK1 dans une optique de stratification de patients et d'orientation thérapeutique mais aussi pour soutenir le développement de nouveaux traitements.

A l'heure actuelle, plusieurs études ayant pour but d'imager SK1 et ses voies de signalisation ont été réalisées non pas à des fins oncologiques mais afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans la neuroinflammation. Par exemple, le groupe de Lin *et al* a imagé l'expression de SK1 par fluorescence *in vitro* et par immunohistochimie avec des anticorps anti-SK1 sur des cellules microgliales.²⁴⁰ D'autres études en imagerie de fluorescence avec une sphingosine modifiée par un groupement fluorescent permettent de suivre l'activité de la kinase en temps réel.²⁴¹

Par ailleurs, plusieurs radiotraceurs pour l'imagerie TEMP et TEP ciblant les récepteurs S1P1-5 de la sphingosine-1-phosphate ont été développés. Par exemple, le groupe de Ye *et al.* a développé un anticorps marqué au ^{99m}Tc montrant une bonne fixation aux récepteurs *in vitro*

ainsi que sur des modèles murins xéno-gréffés surexprimant ces récepteurs.²⁴² Le [¹¹C]CS1P1 marqué au carbone-11 et son analogue marqué au fluor-18, le [¹⁸F]FS1P1, ont été développés pour cibler ces mêmes récepteurs dans un contexte de compréhension de processus neuro-inflammatoires (Figure III.3). Le [¹¹C]CS1P1 possède une autorisation de mise sur le marché²⁴³ alors que son analogue fluoré montre une bonne pénétration cérébrale chez le macaque.²⁴⁴

Cependant, si ces traceurs ciblent les récepteurs S1P, il n'existe pas à ce jour de radiotraceurs pour l'imagerie TEP ciblant directement la protéine SK1 dans un contexte oncologique.

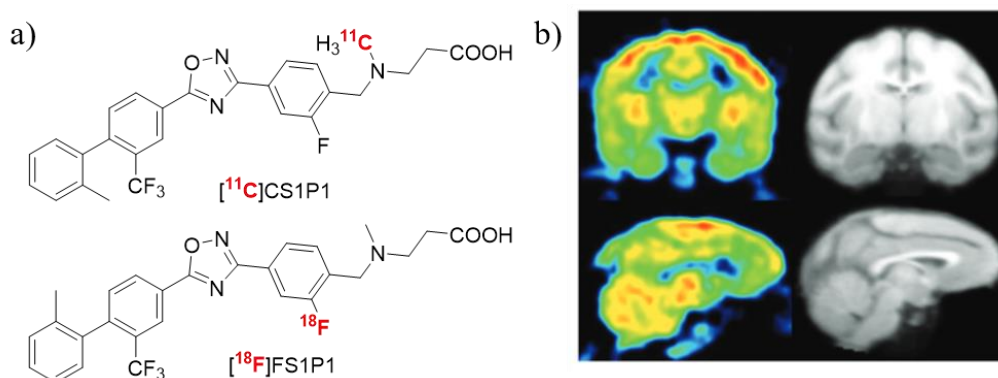


Figure III.3: Imagerie TEP des récepteurs S1P1 par le groupe de Qiu *et al.*²⁴⁴ a) Structure des traceurs [¹¹C]CS1P1 et [¹⁸F]FS1P1 b) Images TEP et IRM d'un cerveau de macaque injecté avec le [¹⁸F]FS1P1

En conclusion, la protéine SK1, surexprimée dans un grand nombre de cancers et facteur de mauvais pronostic, serait un biomarqueur de choix pour l'imagerie TEP dans une démarche de médecine personnalisée. De plus, la grande diversité d'inhibiteurs ayant été développés est une base solide pour la conception de nouveaux traceurs marqués au fluor-18 ciblant la protéine SK1.

II.1.

II. Développement de radiotraceurs ciblant la protéine SK1

Le composé PF-543 : un motif prometteur

Pour observer la surexpression de la protéine SK1 grâce à l'imagerie TEP, il est nécessaire de développer des traceurs possédant une bonne affinité et sélectivité pour la cible choisie. Le composé PF-543 étant l'un des meilleurs dans ce domaine et le groupe de Kim *et al* a développé un inhibiteur de SK1 analogue possédant une bonne activité anti-tumorale sur des cellules de

cancer colorectal et de cancer gastrique (Figure III.4). Le composé développé possède un IC_{50} de 10 nM pour SK1. Enfin, des études de prédiction d'interactions électrostatiques entre la molécule développée et la kinase montreraient des interactions similaires à celles identifiées pour le composé PF-543 vis-à-vis de SK1.¹⁰⁸

La structure du composé identifié par Kim *et al.* diffère du composé PF-543 par le remplacement du groupe sulfonylbenzene par une longue chaîne aliphatique, mimant la queue hydrophobe du ligand naturel sphingosine.¹⁰⁸ Le groupement polaire nécessaire à l'activité biologique de l'inhibiteur est ici un motif pyrrolidine méthanol.

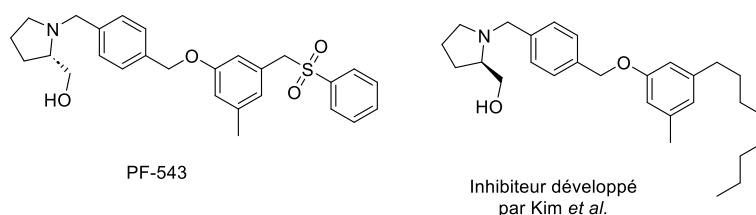


Figure III.4: Structures de l'inhibiteur PF-543 et de l'inhibiteur développé par Kim *et al.*¹⁰⁸

II.2. Objectifs des travaux

En partant de cette structure développée par Kim et ses collègues, il a été décidé d'y intégrer un atome de fluor à l'extrémité d'une chaîne aliphatique pour conduire au composé **FH-SK1** (Figure III.5). Cette approche présente le double avantage de réaliser d'une part une modification mineure sur la structure du composé développé par Kim *et al.*, et d'autre part d'envisager un marquage au fluor-18 par S_N2 aliphatique, une approche radiochimique offrant généralement de bons rendements de radiosynthèse. Le précurseur de marquage du composé $[^{18}F]$ **FH-SK1** présenterait alors un groupement partant de type tosylate au bout de la chaîne aliphatique. L'introduction d'un groupement protecteur de la fonction hydroxyle de type acétate est également envisagée, les fonctions protiques pouvant être délétères au marquage avec des ions fluorures. Le radiomarquage de ce précurseur pourrait alors s'effectuer dans des conditions classiques de radiofluoration aliphatique en présence du complexe $K[^{18}F]F-K_{222}$ suivi d'une déprotection de la fonction acétate en milieu basique.

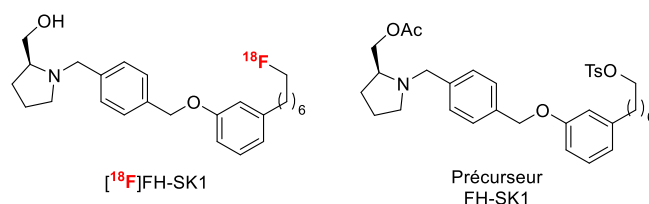


Figure III.5: Structures du traceur envisagé $[^{18}\text{F}]\text{FH-SK1}$ et de son précurseur de marquage

III. Développement du radiotracer $[^{18}\text{F}]\text{FH-SK1}$

Synthèse de la référence FH-SK1 et de son précurseur de marquage

III.1. Stratégie passant par une étape d'hydrogénation tardive

Le composé de référence **FH-SK1** pourrait être obtenu à partir de son précurseur de marquage par fluoration nucléophile suivie d'une déprotection de la fonction acétate (Schéma III.2). Le précurseur de marquage, quant à lui, pourrait être synthétisé par tosylation d'un alcool primaire, la chaîne heptyle étant introduite par coulage de Sonogashira sur le dérivé iodoaryle suivie par une étape de réduction de l'alcyne. La fonction pyrrolidine méthanol protégée serait introduite sur ce dérivé iodé par amination réductrice sur un dérivé benzaldéhyde lui-même formé à partir du 3-iodophénol et du 4-bromométhylbenzaldéhyde commerciaux. Cette stratégie permet de fonctionnaliser les deux fonctions alcools à différentes étapes de la synthèse pour éviter des problèmes de régiosélectivité.

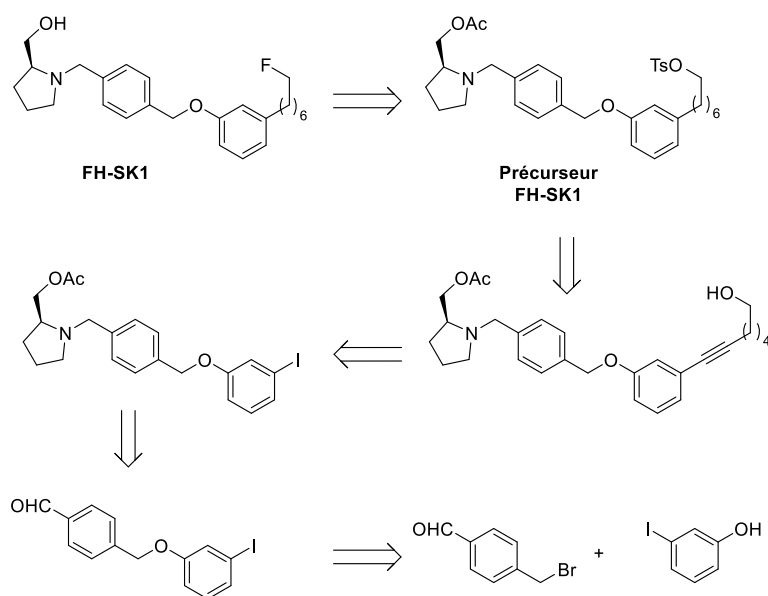


Schéma III.2 : Analyse rétrosynthétique conduisant à l'obtention du composé **FH-SK1** et de son précurseur de marquage par une étape d'hydrogénation tardive

La synthèse débute par l'alkylation du 2-iodophénol par le 2-bromométhylbenzaldéhyde en présence de carbonate de potassium dans le DMF à 80°C (Schéma III.3). Le composé **50** est alors obtenu avec un bon rendement de 86%. La réaction d'amination réductrice entre **50** et la (*S*)-pyrrolidinéméthanol en présence de triacétoxyborohydrure de sodium dans le dichlorométhane à température ambiante permet de former le composé **51** avec un bon rendement de 81%. La fonction alcool du composé **52** est alors protégée par un groupement acétate en présence d'anhydride acétique et de pyridine à température ambiante durant 6h pour conduire au composé **52** avec un rendement de 73%. La chaîne hept-6-yn-1-ol est alors introduite par couplage de Sonogashira avec le composé **52** en présence de Pd(PPh₃)₂Cl₂, de triéthylamine et d'iodure de cuivre dans le DMF sous atmosphère inerte à 70°C durant 2h. Le composé **53** ainsi formé a été obtenu avec un bon rendement de 88%. L'intermédiaire **53** est ainsi obtenu avec un rendement global de 45% sur 4 étapes.

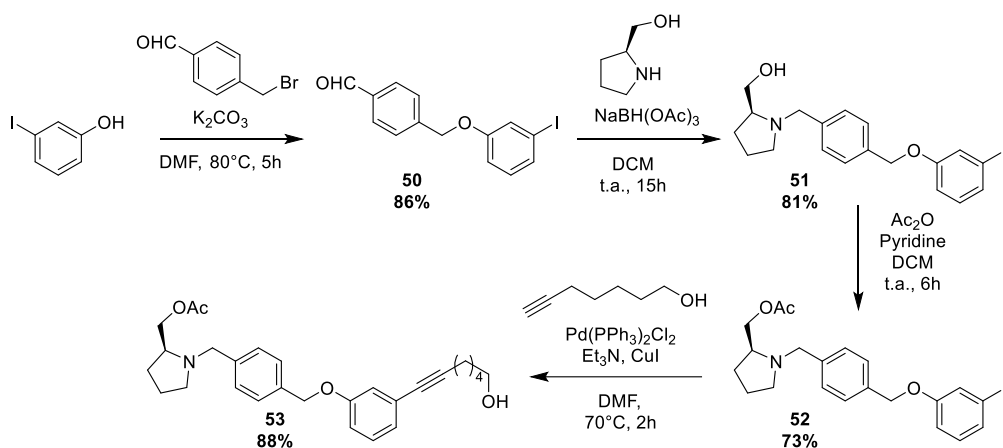


Schéma III.3: Synthèse du composé **53**

Ensuite, la réduction de la fonction alcyne a été envisagée pour conduire à la chaîne heptyle saturée désirée. Ainsi, le composé **53** a été mis en présence de palladium supporté sur charbon dans le méthanol sous atmosphère d'hydrogène à température ambiante (Schéma III.4). Cependant, seuls deux produits non désirés ont été obtenus. Ils résulteraient de l'hydrogénolyse de la fonction benzyle présente sur la molécule. Les produits obtenus n'ont pas été isolés et leurs structures est supposée par le résultat des analyses LC-MS.

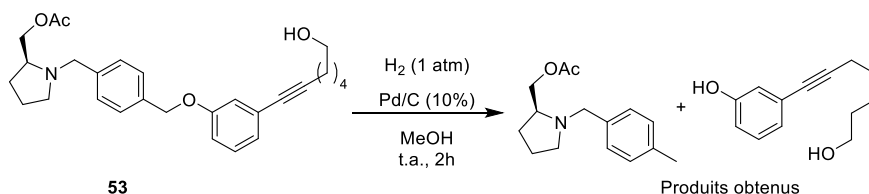


Schéma III.4: Hydrogénolyse du composé **53** menant à la rupture de la liaison benzylique

Cette voie de synthèse aboutit donc à une incompatibilité entre la réduction de la fonction alcyne et la présence de la fonction benzyle. Ainsi, une nouvelle voie de synthèse a été envisagée.

III.1.2.

Stratégie passant par une réduction précoce

Cette nouvelle stratégie passe par l'introduction de la chaîne aliphatique en début de synthèse, pour contourner l'incompatibilité de l'hydrogénation. Ainsi, le composé **FH-SK1** serait toujours obtenu à partir du précurseur de marquage par réaction de fluoruration du groupement

tosylate puis par déprotection de l'acétate protégeant l'alcool primaire situé sur la pyrrolidine. Ce précurseur pourrait être obtenu par tosylation de la fonction hydroxyle localisée à l'extrémité de la chaîne aliphatique. L'alcool primaire serait quant à lui obtenu à partir d'un dérivé benzaldéhyde par amination réductrice avec le motif pyrrolidineméthanol suivie d'une étape de déprotection d'un groupement silylé encombré et relativement stable comme le TBDPS utilisé pour protéger l'alcool primaire tout au long de la synthèse. Le dérivé benzaldéhyde pourrait être synthétisé par alkylation du groupement phénol, lui-même obtenu par hydrogénation de l'alcyne. Enfin ce composé serait obtenu par couplage de Sonogashira à partir du 3-iodophénol et de l'hept-6-yn-1-ol commerciaux dont ce dernier serait protégé avec un groupement silylé de type TBDPS (Schéma III.5).

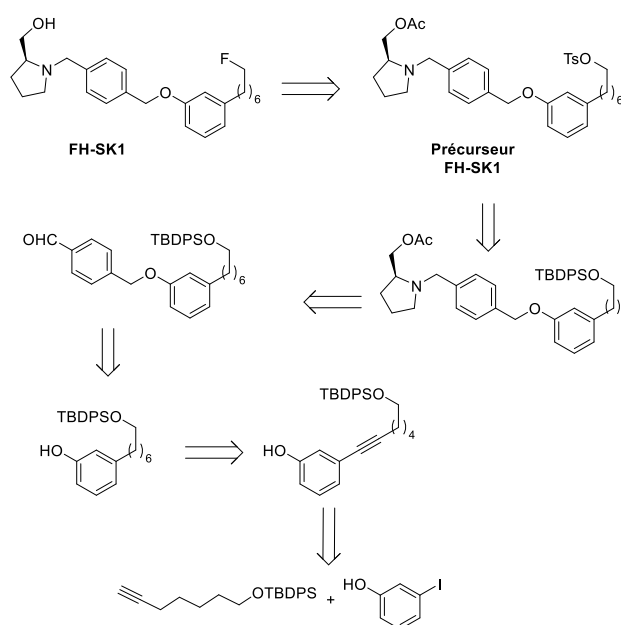


Schéma III.5: Analyse rétrosynthétique par hydrogénation précoce conduisant au composé **FH-SK1**

Nous avons dans un premier temps envisagé de protéger la fonction hydroxyle du hept-6-yn-1-ol par un groupement silylé, conservé tout au long de la synthèse dans le but de ne pas obtenir un composé présentant deux fonctions alcools primaires dont la différenciation serait complexe. Inspiré de l'approche de Trenkle *et al.*,²⁴⁵ le groupement TBDPS a été choisi comme groupement protecteur. Ce dernier est orthogonal au groupement acétate envisagé pour la protection du groupement pyrrolidine méthanol et est suffisamment stable pour résister à diverses conditions réactionnelles. L'hept-6-yn-1-ol a donc été mis en réaction avec le chlorure de *tert*-butyldiphénylsilyle en présence d'imidazole dans le DMF à température ambiante durant 15h, conduisant au composé **54** avec un rendement de 63% (Schéma III.6). Ce composé

a ensuite été engagé dans un couplage de Sonogashira avec le 3-iodophénol en présence de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$, de triéthylamine et d'iodure de cuivre dans le DMF sous atmosphère inerte à 70°C durant 2h, pour conduire au composé **55** avec un rendement de 65%. Le composé **55** a ensuite été soumis à une réaction d'hydrogénation en présence d'hydrogène et de palladium supporté sur charbon dans le méthanol dans le but de réduire l'alcyne en alcane. Cependant, aucune réaction n'a pu être observée et le produit de départ a pu être totalement récupéré. Une hypothèse envisagée serait que la présence du groupement silylé très encombré empêcherait l'approche de la triple liaison sur le catalyseur.

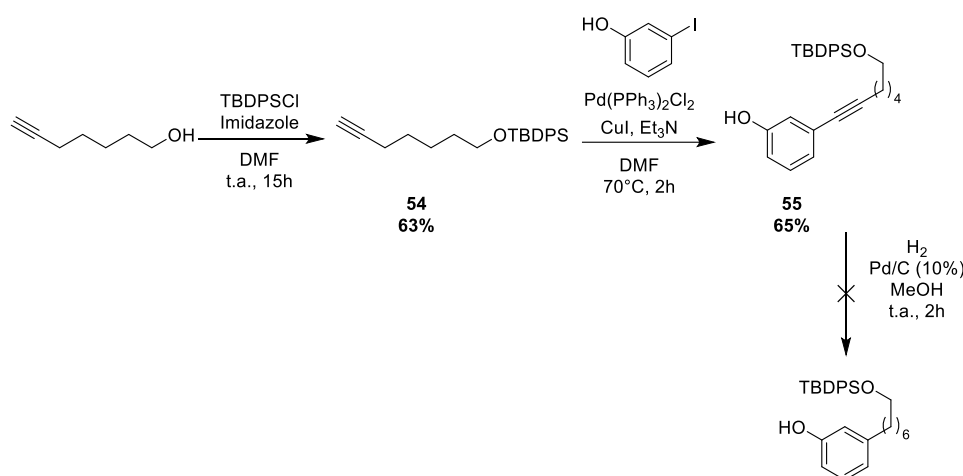


Schéma III.6: Synthèse du composé **55** et tentative d'hydrogénation

Devant les problèmes d'hydrogénation rencontrés, il a été envisagé de protéger la fonction hydroxyle après l'hydrogénation de l'alcyne. Dans ce contexte, la nouvelle synthèse débute par un couplage de Sonogashira entre le 3-iodophénol et hept-6-yn-1-ol en présence de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$, de triéthylamine et d'iodure de cuivre dans le DMF sous atmosphère inerte à 70°C durant 2h, conduisant au diol **56** avec un rendement de 90% (Schéma III.7). Ce dernier est alors soumis à une réaction d'hydrogénation en présence de palladium sur charbon dans le méthanol à température ambiante conduisant au phénol **57** avec un rendement de 84%. Ce composé a ensuite été engagé dans une réaction d'alkylation avec le 3-bromométhylbenzaldéhyde commercial en présence de carbonate de potassium dans le DMF à 80°C conduisant à l'aldéhyde **58** avec un faible rendement de 29%. Ce faible rendement s'explique par le fait qu'une partie du produit de départ n'a pas totalement réagi dans ces conditions, même lorsque le temps de réaction est prolongé jusqu'à 24h. La protection de l'alcool primaire a ensuite été réalisée avec le groupement *tert*-butyldiméthylsilyle (TBS) choisi pour son compromis entre stabilité et encombrement moindre que le groupement TBDPS utilisé

antérieurement. Le composé **58** a donc été mis en réaction en présence du chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle et d'imidazole dans le DCM durant 15h à température ambiante, conduisant au composé silylé **59** avec un rendement de 53%. Ensuite, la molécule **59** a été engagée dans une réaction d'amination réductrice avec le (*S*)-pyrrolidinéméthanol en présence de triacétoxyborohydrure de sodium dans le DCM à température ambiante pour conduire au dérivé **60** avec un excellent rendement de 84%. Le composé **60** a été obtenu avec un rendement global de 10% sur 5 étapes.

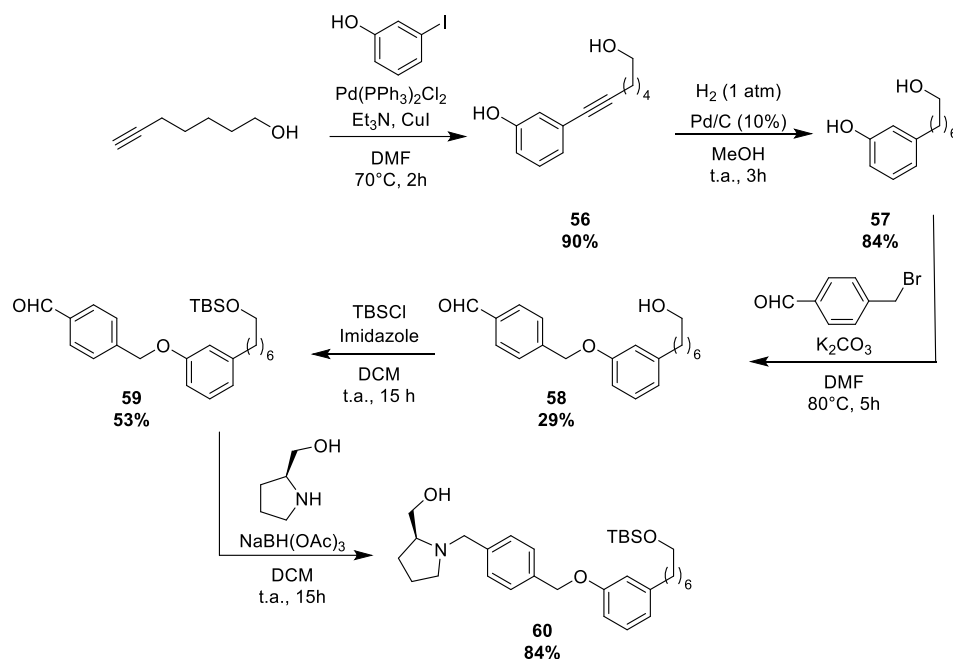


Schéma III.7: Synthèse du composé **60**

Ensuite, la fonction hydroxyle du motif pyrrolidinéméthanol du composé **60** a été protégée en présence d'anhydride acétique et de pyridine dans le DCM à température ambiante durant 15h pour conduire à l'acétate **61** avec un bon rendement de 84% (Schéma III.8). La suite de la synthèse nécessite la fonctionnalisation du groupement hydroxyle situé à l'extrémité de la chaîne heptyle. Pour cela, le groupement silyle du composé **61** est clivé en présence de fluorure de *n*-tétrabutylammonium (TBAF) dans le THF à température ambiante durant 8h. L'alcool primaire **62** est alors obtenu avec un bon rendement de 94%. Sa fonction hydroxyle est alors tosylée *via* l'utilisation du chlorure de tosyloxy en présence de Et₃N dans le DCM à température ambiante. Le précurseur de marquage **63** est alors obtenu avec un rendement de 55%.

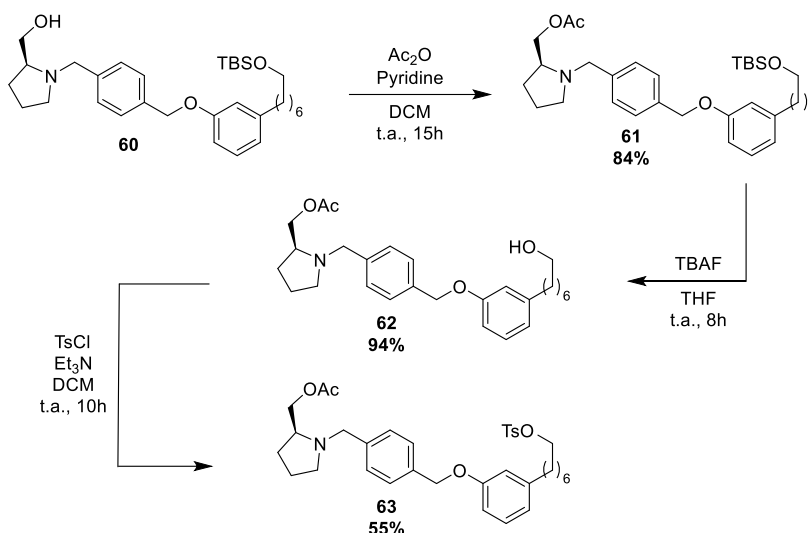


Schéma III.8: Synthèse du précurseur de marquage **63**

A partir du précurseur **63**, la stratégie consiste à obtenir le composé fluoré de référence. Le composé **63** est donc mis en réaction avec du TBAF dans le THF à température ambiante selon une réaction de substitution nucléophile (Schéma III.9). Le composé fluoré **64** est alors obtenu avec un rendement de 90%. Enfin, le groupement protecteur acétate présent sur la pyrrolidine méthanol est clivé en présence de méthanolate de sodium dans le méthanol pour conduire au composé **FH-SK1** avec un rendement de 92%.

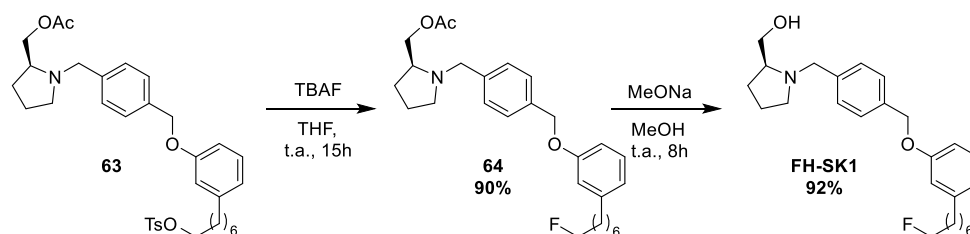


Schéma III.9: Synthèse du composé **FH-SK1** à partir du précurseur de marquage **63**

Finalement, le précurseur de marquage **63** et le composé **FH-SK1** ont été obtenus avec des rendements de 4% et 3% en 8 et 10 étapes respectivement.

Radiomarquage au fluor-18 du précurseur **63**

Le radiomarquage du précurseur **63** au fluor-18 est envisagé en deux étapes : une étape de radiofluoruration par S_N2 en présence d'ions fluorures suivie d'une étape de déprotection de la

fonction acétate. Dans un premier temps, seule la radiofluoruration a été étudiée (Schéma III.10). Elle a été effectuée dans des conditions standards en présence du complexe $K[^{18}F]F-K_{222}$ dans le DMSO en utilisant 4 mg de précurseur **63** et en fixant le temps de réaction à 10 minutes.

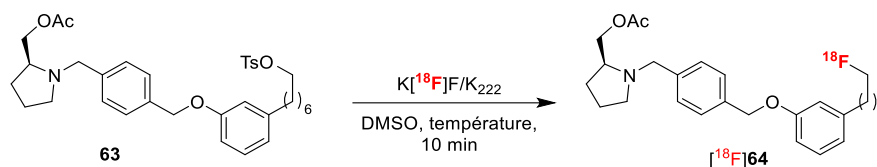


Schéma III.10: Première étape de radiomarquage au fluor-18 du composé **63**

Différentes conditions de température ont été testées et la conversion radiochimique a été évaluée par radio-CCM (Tableau III.1). Ces essais de radiomarquage ont été menés sur un module de synthèse GE TracerlabTM FX FN.

Le composé **63** a donc été mis en réaction en présence du complexe $K[^{18}F]F-K_{222}$ à 90 °C durant 10 min. Dans ces conditions, une conversion de 30% a été observée (Tableau III.1, entrée 1). Une augmentation de la température de réaction jusqu'à 110°C a permis d'obtenir une conversion très satisfaisante de 58% (Tableau III.1, entrée 2). Afin d'observer si une élévation de la température permettrait encore d'améliorer cette conversion, le radiomarquage a été effectué à 140°C durant 10 minutes. Dans ces conditions, une plus faible conversion de 35% a été observée, témoignant probablement de la dégradation du précurseur ou du produit final à cette température (Tableau III.1, entrée 3). Ainsi, des conditions de marquage de 110°C durant 10 minutes ont été sélectionnées pour poursuivre l'optimisation et notamment la deuxième étape de déprotection. Un exemple de radio-CCM montrant cette conversion de 58% est présentée en figure III.6.

Entrée ^a	Température (°C)	RCC (%) ^b
1	90	30
2	110	58
3	140	35

^aLes expériences ont été réalisées deux fois

^bLa conversion en $[^{18}F]64$ a été mesurée par radio-CCM par rapport aux ions fluorures n'ayant pas réagi

Tableau III.1: Conditions testées pour le radiomarquage du composé **63** au fluor-18

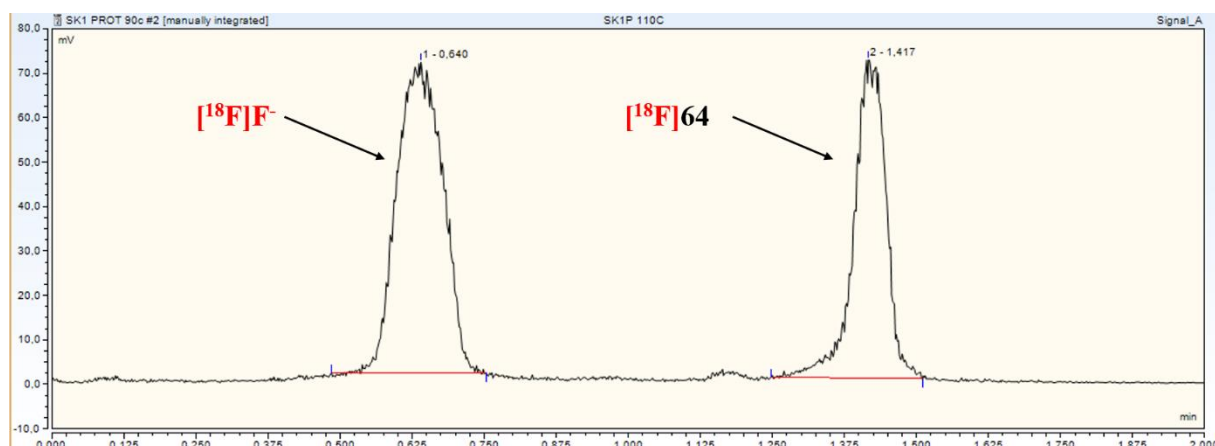


Figure III.6: Radio-CCM montrant la conversion en $[^{18}\text{F}]\mathbf{64}$ (58%) par rapport aux ions $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ lorsque la radiofluoruration est menée à 110 °C pendant 10min dans le DMSO

Un premier essai de déprotection a été mené en présence de 300 μL de soude (4 M) à 70 °C durant 5 minutes. Dans ces conditions, 80% du produit protégé réagit pour former le produit désiré. Il a donc été décidé d'augmenter la température pour augmenter cette conversion. Ainsi, à 100°C durant 5 minutes, le composé $[^{18}\text{F}]\mathbf{FH-SK1}$ est l'unique produit obtenu et aucune trace du composé intermédiaire $[^{18}\text{F}]\mathbf{64}$ n'est observée. Ces conditions ont donc été conservées pour procéder à l'automatisation du radiomarquage (Schéma III.11).

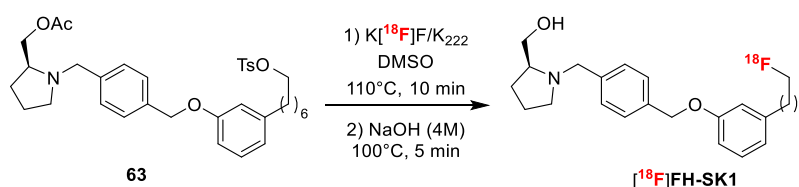


Schéma III.11: Radiomarquage en deux étapes du composé **63** conduisant au composé $[^{18}\text{F}]\mathbf{FH-SK1}$

Le radiomarquage en deux étapes du composé **63** a été automatisé sur un module de synthèse GE TracerlabTM FX FN. Le précurseur **63** (4 mg) est donc mis en réaction avec le complexe $\text{K}[^{18}\text{F}]\text{F-K}_{222}$ dans le DMSO à 110°C durant 10 minutes. La déprotection est ensuite réalisée « one pot » par ajout de 300 μL de soude 4M au milieu réactionnel et la réaction est chauffée à 100°C durant 5 minutes. Le milieu a ensuite été élué au travers d'une cartouche d'alumine afin d'éliminer les ions fluorures qui n'auraient pas réagi. La purification du composé brut a été réalisée par chromatographie semi-préparative sur colonne Zorbax C18 en utilisant un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{TFA}$ 35/65/0,1 (v/v/v) comme éluant (Figure III.7). Une étape de formulation sur cartouche C18 a permis d'obtenir le composé $[^{18}\text{F}]\mathbf{FH-SK1}$ ($6,3 \pm 0,7$ GBq) en 80 minutes de synthèse avec un rendement corrigé de la décroissance de $33\% \pm 7$ ($n = 5$).

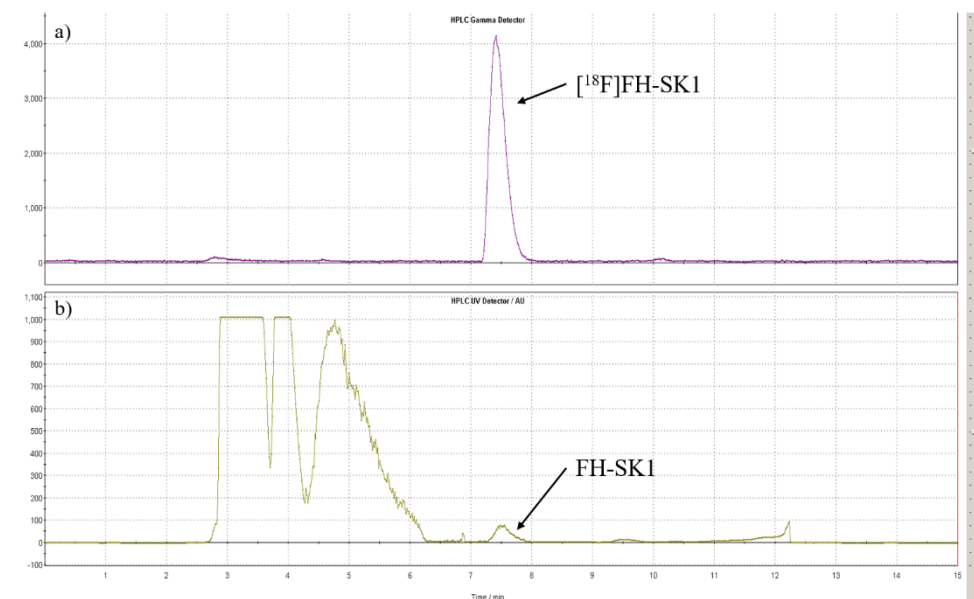


Figure III.7: Purification du $[^{18}\text{F}]\text{FH-SK1}$ par HPLC semi-préparative avec détection UV (254 nm) et gamma en phase inverse. a) Chromatogramme gamma du composé $[^{18}\text{F}]\text{FH-SK1}$; b) Chromatogramme UV du composé **FH-SK1**

Le contrôle qualité du radiotraceur a ensuite été effectué par HPLC analytique avec détection UV (254 nm) et gamma afin de s'assurer de l'identité du composé synthétisé ainsi que de sa pureté chimique et radiochimique (Figure III.8). L'analyse par HPLC analytique montre une correspondance des temps de rétention entre le chromatogramme gamma du composé pur synthétisé et le composé de référence non radioactif dans les mêmes conditions d'analyse. Le composé $[^{18}\text{F}]\text{FH-SK1}$ a été obtenu avec une pureté radiochimique supérieure à 99% et une activité molaire de $41,8 \pm 4,0$ GBq/ μmol témoignant d'une bonne pureté chimique du traceurs synthétisé (n = 5).

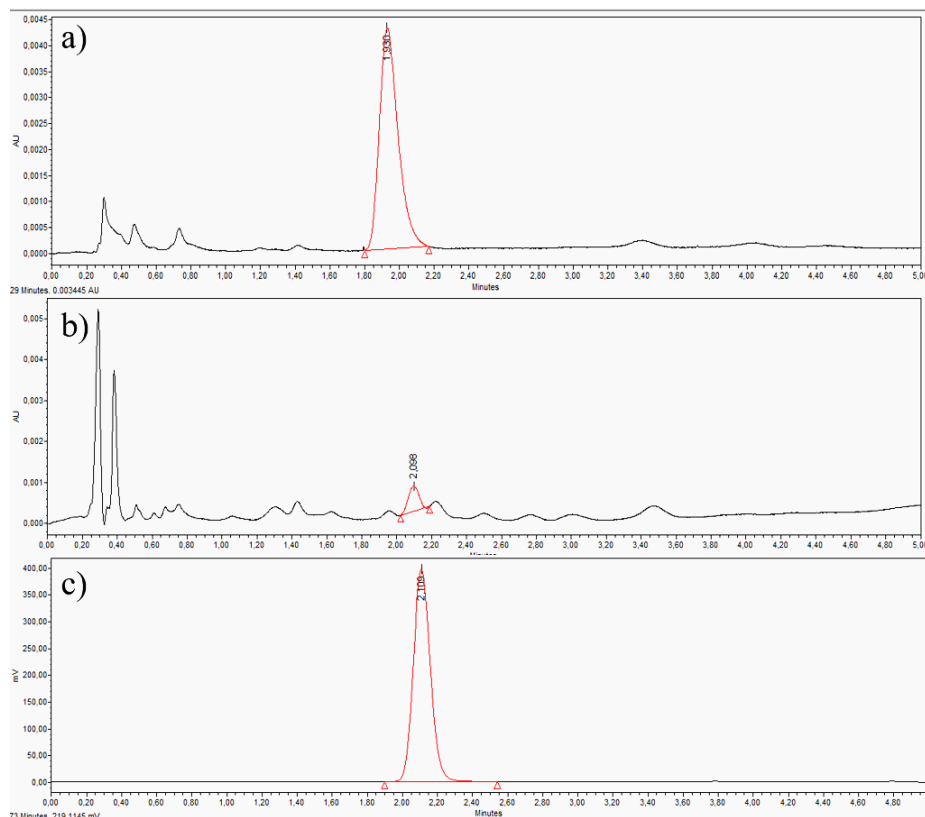


Figure III.8 Contrôle qualité du composé $[^{18}\text{F}]\text{FH-SK1}$ réalisé par HPLC analytique sur phase inverse C18 avec détection UV (254 nm) et gamma. a) Chromatogramme UV du composé **FH-SK1** de référence non radioactif ; b) Chromatogramme UV du composé $[^{18}\text{F}]\text{FH-SK1}$; c) Chromatogramme gamma du composé $[^{18}\text{F}]\text{FH-SK1}$

En conclusion, l'optimisation des conditions de marquage du composé $[^{18}\text{F}]\text{FH-SK1}$ et l'automatisation du procédé a permis d'obtenir le traceur « prêt pour injection » avec une quantité d'activité suffisante (3-6,5 GBq) ainsi qu'avec une pureté chimique et radiochimique et une activité molaire permettant d'envisager des applications *in vivo* pour ce radiotracer.

IV.1.

IV. Evaluation biologique du composé **FH-SK1**

Evaluation de l'affinité du traceur $[^{18}\text{F}]\text{FH-SK1}$ pour la protéine SK1

La fixation du traceur $[^{18}\text{F}]\text{FH-SK1}$ pour la protéine SK1 a été mesurée par incubation de ce composé sur des cellules 22RV1 du cancer de la prostate surexprimant la protéine sphingosine kinase 1.²⁴⁶ Pour cela, les cellules 22RV1 ont été incubées en présence de différentes concentrations (10 – 2000 nM) du composé $[^{18}\text{F}]\text{FH-SK1}$ (Figure III.9.a). Par ailleurs, un test de déplacement a été effectué pour s'assurer de la spécificité de la fixation en présence d'un

excès molaire du composé PF-543 (Figure III.9.b). Ces expériences ont démontré une saturation de la protéine par le traceur développé. De plus, nous observons une diminution du signal radioactif en présence de l'inhibiteur PF-543, significative à partir d'une concentration de 250 nM du composé [¹⁸F]FH-SK1. La fixation du traceur développé est donc spécifique de la protéine sphingosine kinase 1, avec une constante d'inhibition mesurée de 375 nM pour cette lignée cellulaire. Cette évaluation *in vitro* de l'affinité du traceur pour sa cible est encourageante. Ainsi, une évaluation *in vivo* du composé [¹⁸F]FH-SK1 sera envisagée sur modèles murins xénotransplantés.

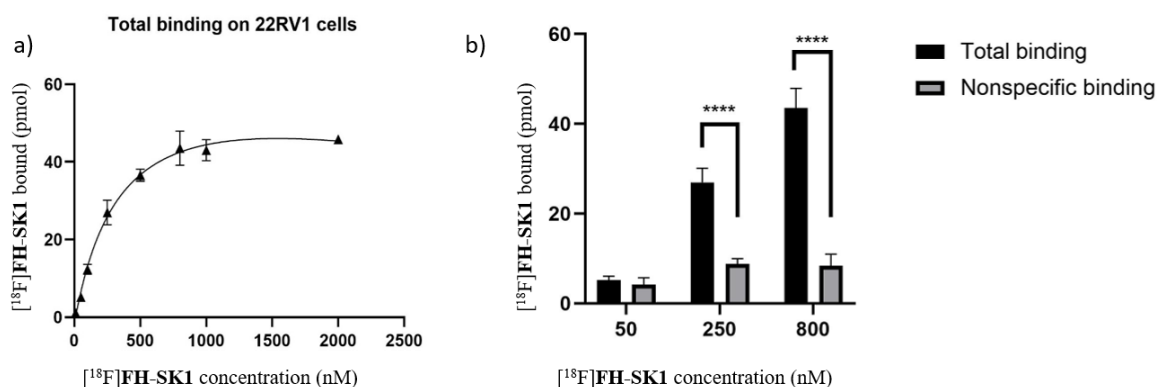


Figure III.9: a) Expériences de binding du traceur [¹⁸F]FH-SK1 sur cellules 22RV1 à différentes concentrations (10-2000 nM) ; b) évaluation de la fixation spécifique du traceur sur les cellules 22RV1

V. Conclusions et perspectives

La possibilité de détecter la surexpression de la protéine SK1 grâce à l'imagerie TEP serait un puissant outil diagnostique pour l'orientation des traitements et le suivi thérapeutique. Dans ce contexte, un analogue du composé PF-543, un inhibiteur de SK1 développé à des fins thérapeutiques, a été identifié par le groupe de Kim *et al* et après pharmacomodulation, la structure du composé **FH-SK1** a été imaginée. Les synthèses de ce composé ainsi que son précurseur de marquage ont été effectuées en 10 et 8 étapes avec des rendements de 3% et 4% respectivement. Le radiomarquage au fluor-18 du précurseur a été optimisé et automatisé conduisant à l'obtention du composé [¹⁸F]FH-SK1 « prêt pour injection » avec un rendement de 33 ± 7 % corrigé de la décroissance et une activité molaire de 41.8 ± 4.0 GBq/ μ mol (n=5). L'affinité du traceur pour sa cible a été évaluée *in vitro* sur des cellules surexprimant la protéine

SK1. Les expériences ont montré une fixation spécifique du traceur pour la cible nous encourageant à poursuivre l'évaluation de ce traceur

CHAPITRE IV :
DÉVELOPPEMENT DE
RADIOTRACEURS POUR
L'IMAGERIE TEP DE LA
DÉMYÉLINISATION

I. Imagerie TEP des maladies neurologiques

Justification de ce travail à la marge des travaux de thèse

Ce chapitre, situé à la marge du reste de ces travaux de thèse, résulte de la poursuite d'un projet commencé lors d'un précédent stage effectué en 2016 au laboratoire. Il avait pour but de développer des composés fluorés analogues au méthyl-diaminostilbène (MeDAS), un composé ciblant la myéline dont le marquage isotopique au carbone-11 permet de visualiser les processus de démyélinisation grâce à l'imagerie TEP. Dans ce contexte, nous avons développé trois analogues fluorés du MeDAS et leur fixation à la myéline a été démontrée *ex vivo* par imagerie de fluorescence sur des coupes de cerveaux de rats sains. Ils ont tous les trois montré un profil métabolique intéressant *in vitro*. Le composé PEG-MeDAS a été marqué au fluor-18 avec un bon rendement et la biodistribution *in vivo* a montré une bonne pénétration cérébrale. Cependant, il a été montré que le motif diaminostilbène était sujet à un processus d'isomérisation *in vivo*. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour déterminer l'influence de cette isomérisation quant à l'affinité de la structure pour la myéline.

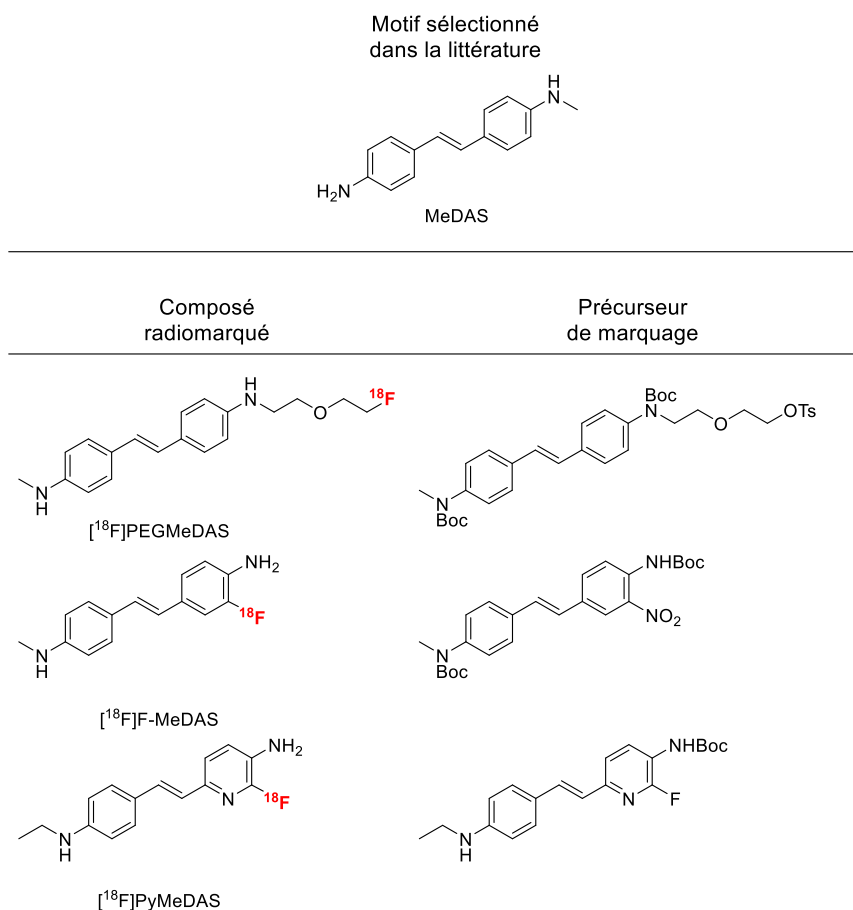


Figure IV.1: MeDAS et les dérivés fluorés envisagés

Ces travaux, commencé lors de mon stage en 2016, ont été poursuivis au cours de mes 3 années de doctorat. C'est pourquoi j'ai souhaité inclure ces travaux dans mon manuscrit. Au-delà du travail de chimie et de radiochimie, l'évaluation biologique des traceurs préparés m'a permis de découvrir et de pratiquer de nouvelles techniques expérimentales, comme la réalisation d'études de biodistribution et l'évaluation du profil métabolique des radiotraceurs. Ces travaux ont été publiés dans la revue « Journal of Medicinal Chemistry » dont l'article est présenté ci-après.

Design, Radiosynthesis and Evaluation of New Fluorinated Analogs of MeDAS for Myelin PET Imaging

Pour des questions de droit, une figure a été retirée

I.2.

Pour des questions de droit, une figure a été retirée

Pour des questions de droit, une figure a été retirée

Pour des questions de droit, une figure a été retirée

Pour des questions de droit, une figure a été retirée

Pour des questions de droit, une figure a été retirée

Pour des questions de droit, une figure a été retirée

Pour des questions de droit, une figure a été retirée

Pour des questions de droit, une figure a été retirée

Pour des questions de droit, une figure a été retirée

Pour des questions de droit, une figure a été retirée

Pour des questions de droit, une figure a été retirée

Pour des questions de droit, une figure a été retirée

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce dossier de thèse se compose de trois parties principales, chacune dédiée à l'une des cibles pharmacologiques sélectionnées pour le développement de radioligands pour l'imagerie TEP des dérégulations cellulaires en oncologie : p53, focal adhesion kinase et sphingosine kinase 1. Ces travaux s'appuient sur le développement de structures analogues de pharmacophores décrits dans la littérature comme possédant une bonne affinité pour les cibles. Ces motifs moléculaires retenus ont pu être pharmacomodulés pour pouvoir réaliser un marquage au carbone-11 ou au fluor-18. Une quatrième partie présente des travaux de développement de traceurs marqués au fluor-18 pour l'imagerie de la démyélinisation dans un contexte de maladie auto-immune. Les projets présentés dans ce manuscrit décrivent la synthèse organique de nouveaux composés ainsi que leur caractérisation et, pour certains candidats, le marquage au fluor-18 ou au carbone-11 du précurseur synthétisé ainsi que l'évaluation *in vitro* ou *in vivo* des radiotraceurs obtenus.

Conclusions et perspectives concernant les ligands de p53

La première cible présentée est la protéine gardienne du génome p53 pouvant être mutée et inactive dans un grand nombre de cancers. Détecter sa présence *in vivo* en oncologie grâce à l'imagerie TEP permettrait de réaliser un suivi thérapeutique et participerait au développement de traitements dans un contexte de médecine personnalisée.

Le composé **CP31398** a été développé dans ce contexte comme candidat médicament, il permettrait de rétablir les fonctions biologiques de réparation de l'ADN de la protéine p53. Ce composé ainsi que son précurseur de marquage ont été synthétisés avec des rendements globaux de 69% et 52% en 2 et 3 étapes respectivement. Le radiomarquage automatisé au carbone-11 a été réalisé avec succès et a conduit à l'obtention du composé [¹¹C]CP31398 avec un rendement de 42 ± 13 % corrigé de la décroissance et une activité molaire de 39 ± 12 GBq/μmol (n = 6). Par ailleurs deux analogues fluorés ont été développés. Premièrement, le composé **PEG-CP31398** ainsi que son précurseur de marquage de type tosylate ont été obtenus avec des rendements globaux de 20% et 13% respectivement en quatre étapes de synthèse. Le composé radiomarké [¹⁸F]PEG-CP31398 a été obtenu avec un rendement radiochimique de 10 ± 4 % corrigé de la décroissance et une activité spécifique de 80 ± 39 GBq/μmol (n = 4). Enfin, un deuxième analogue fluoré et son précurseur ont été développés, en quatre et trois étapes de synthèse respectivement avec des rendements de 33% et 26%. Cependant, le radiomarquage de cette structure n'a pas pu être réalisé malgré les conditions testées.

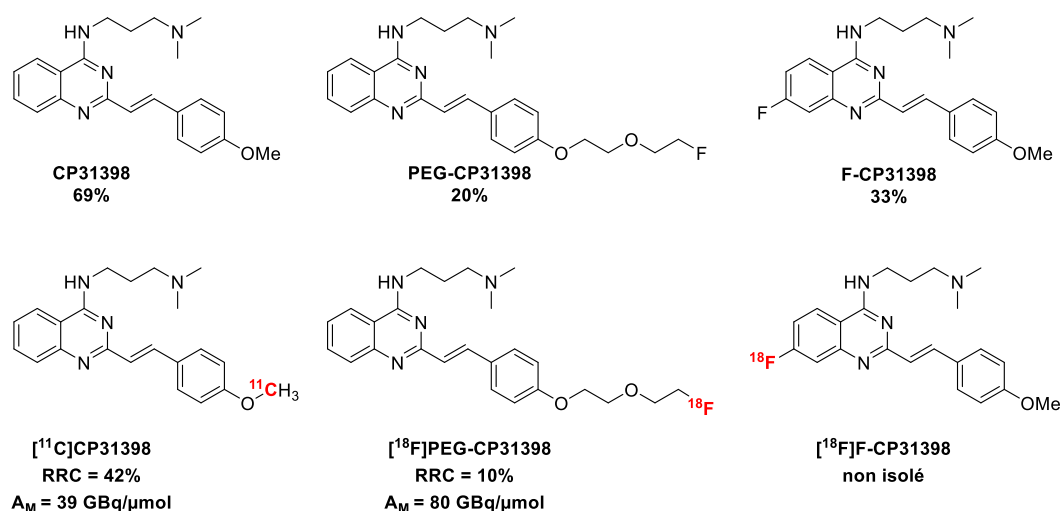


Figure c.1: Structure des références obtenues et les traceurs associés ciblant p53

Par ailleurs, les traceurs développés ont été évalués *in vitro* dans le but de vérifier leur ciblage de p53. Les différentes expériences conduites sur cellules transfectées avec un gène de p53 muté ainsi que sur coupes de tumeurs exprimant ou non la protéine n'ont malheureusement pas pu permettre de démontrer une fixation spécifique des traceurs sur leur cible mais ont révélé une fixation non spécifique.

Il est important de noter que le mécanisme de restauration des fonctions biologiques de p53 n'a pas encore été clairement élucidé à ce jour. Cette cible représente donc un challenge quant au développement de structures affines pour celle-ci ainsi que pour sa détection en imagerie TEP. Les résultats obtenus lors de l'évaluation biologique des composés synthétisés ne nous encourage pas à poursuivre le développement de traceurs ciblant p53, et nous questionnent sur la pertinence de cibler p53 en imagerie TEP, étant donné la faible disponibilité des informations concernant l'affinité de la cible avec des structures moléculaires décrites. Néanmoins, le radiotracer $[^{11}\text{C}]\text{CP31398}$ pourrait être un outil pour élucider le mécanisme d'action de ce composé grâce à l'imagerie TEP.

Conclusions et perspectives concernant les ligands de FAK

La focal adhesion kinase participe aux processus de migration cellulaire et se présente également comme un biomarqueur de l'agressivité tumorale. Il a été décidé de développer des traceurs présentant une haute affinité pour cette kinase en se basant sur la structure d'un inhibiteur covalent développé par le LCBPT. Ce composé **7f** ainsi que son précurseur de

marquage ont été synthétisés avec des rendements de 3% et 5% en neuf et huit étapes de synthèse respectivement. Le marquage isotopique au carbone-11 de cette structure par incorporation directe du $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ étant original, une molécule modèle analogue ainsi que son précurseur de marquage ont été synthétisés dans le but de mettre au point les conditions de radiocarbonylation. Malheureusement les conditions de radiomarquage testées n'ont pas permis d'obtenir des quantités de radiotraceurs suffisantes pour poursuivre le marquage isotopique du composé **7f**. En parallèle, trois analogues fluorés ont été envisagés, mais la synthèse de ce type d'architecture moléculaire complexe n'a pas conduit à l'obtention des composés souhaités. Cependant, un nouvel analogue fluoré, le composé **Ph-FAK**, et son précurseur de marquage sont encore en cours de développement. A ce jour, les résultats sont prometteurs puisque seulement une (**Ph-FAK**) ou deux étapes (précurseur) restent à mettre au point pour obtenir le couple de composés. Par la suite, l'affinité et la sélectivité du composé **Ph-FAK** pour la protéine seront évaluées par des tests de binding avant d'envisager la radiosynthèse au fluor-18 du composé $[^{18}\text{F}]\text{Ph-FAK}$. Enfin, une évaluation biologique *in vitro* (autoradiographie sur coupes de tumeurs) et *in vivo* (biodistribution, animaux xenogreffés avec des cellules tumorales exprimant FAK) du radiotraceur pourra être envisagée.

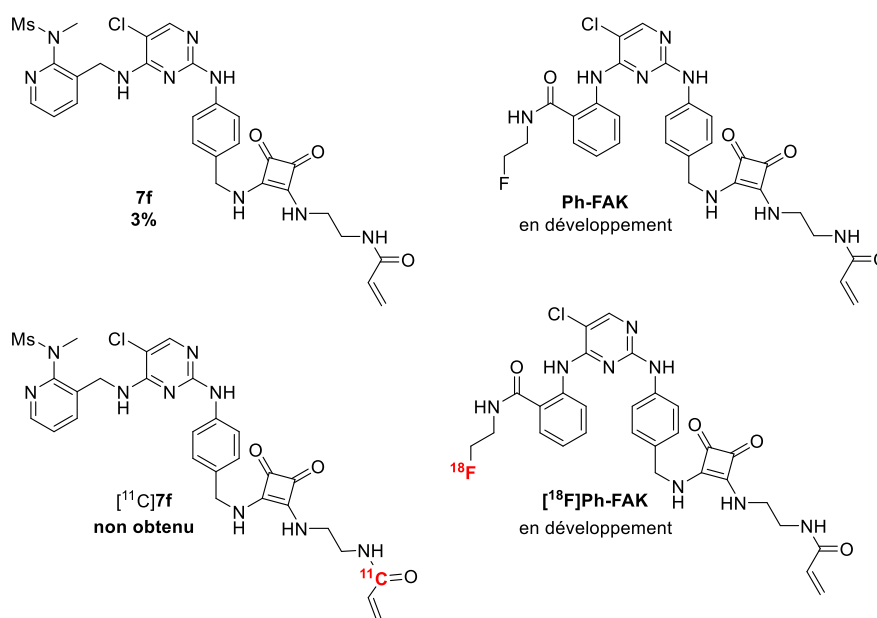


Figure c.2: Structure des composés **7f** et **Ph-FAK** ciblant la protéine FAK

Conclusions et perspectives concernant les ligands de SK1

La protéine sphingosine kinase 1 est une enzyme participant à la voie de signalisation des sphingolipides et à de nombreux processus biologiques tels que la survie ou encore la prolifération cellulaire. Cette protéine est surexprimée dans un grand nombre de cancers et est un facteur de mauvais pronostic. Il est donc intéressant de développer des radiotraceurs ciblant SK1 dans le but de détecter cette surexpression grâce à l'imagerie TEP. Un composé analogue du PF-543, un inhibiteur affin et sélectif de SK1, ainsi que son précurseur de marquage ont été synthétisés avec des rendements de 3% et 4% en dix et huit étapes respectivement. Le radiomarquage conduisant au composé [¹⁸F]FH-SK1 « prêt pour injection » a été optimisé et automatisé avec un rendement de 33 ± 7 % corrigé de la décroissance et une activité molaire de 41,8 ± 4 GBq/μmol (n = 5). Le traceur a été évalué *in vitro* sur des cellules surexprimant la protéine. La fixation spécifique observée nous encourage à poursuivre l'évaluation de ce composé *in vivo*.

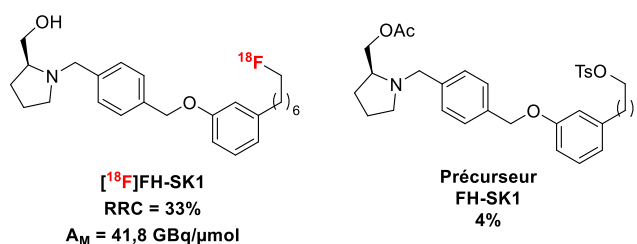


Figure c.3: Traceur [¹⁸F]FH-SK1 et son précurseur de marquage

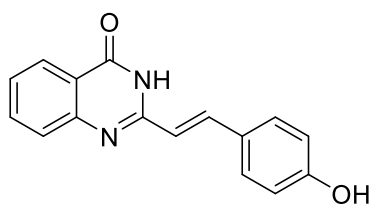
PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. Organic synthesis

I.1. General Procedures

All chemicals and reagents were used as received. Unless otherwise stated, reactions were performed under air atmosphere. Reactions were monitored by TLC (silica gel 60 254F, Merck), visualized thanks to an UV lamp at 254 nm or revealed by a potassium permanganate or a ninhydrin stain. Column chromatographies were performed on silica gel 60 Å, 40-65 µm (Merck). Flash chromatography purifications were realized with a Puriflash PF-XS 520 Plus (Interchim) device. Proton nuclear magnetic resonance (^1H -RMN) and carbon-13 nuclear magnetic resonance (^{13}C -NMR) spectra were recorded on a 400 MHz Bruker Avance (Bruker, USA) apparatus. All NMR spectra were recorded at 23 °C. Proton and carbon chemical shifts (δ) are expressed in parts per million (ppm) downfield from tetramethylsilane and are referenced to the proton resonance of the hydrogenated residue of the deuterated solvents CDCl_3 (CHCl_3 , $\delta = 7.26$ ppm), DMSO-d_6 (DMSO-d_5 , $\delta = 2.50$ ppm) for ^1H -NMR and CDCl_3 (CHCl_3 , $\delta = 77.2$ ppm), DMSO-d_6 (DMSO-d_5 , $\delta = 49.0$ ppm) for ^{13}C -NMR. For ^1H -NMR, data are presented as follows: chemical shifts, multiplicity, (s: singulet, d: doublet, t: triplet, q: quadruplet, m: multiplet, bs: broad signal), coupling constant (J in Hz), integration, and attribution. For ^{13}C -NMR, data are presented as follows: chemical shift, coupling constant (J in Hz), multiplicity and attribution. The melting points were measured on an Electrothermal IA9200 (Dutscher, France) and are reported in °C. The mass spectra (MS) were measured on a Thermo Electron Ion Trap LCQ Deca XP+ spectrometer (ThermoFischer, France) equipped with the electron spray ionization (ESI) technique. Liquid chromatography was performed on Acquity UPLC BEH C18 column (2.1 x 100 mm, 1.7 µm, Waters, France) using a gradient of $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (from 5 % of CH_3CN to 100 % over 8 min, 0.1% formic acid) as the mobile phase.

1.2. Experimental procedures

(E)-2-(4-hydroxystyryl)quinazolin-4(3H)-one (1)

$C_{16}H_{12}N_2O_2$
M.W.: 264.28 g/mol

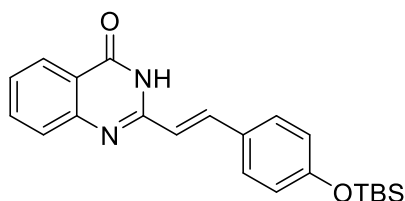
3-Hydroxybenzaldehyde (1.83 g, 15.0 mmol, 2.0 eq) and potassium acetate (2.21 g, 22.5 mmol, 3.0 eq) were added to a solution of 2-méthyl-4(3H)-quinazolinone (1.20 g, 7.5 mmol, 1.0 eq) in glacial acetic acid (30 mL). The reaction mixture was stirred at 110 °C during 24h under argon. Ice water (20 mL) was added to the mixture and the resulting precipitate was filtered, washed with water (20 mL) and dried under vacuum to afford **1** as a yellow powder (1.58 g, 80%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 12.24 (s, 1H, NH), 9.98 (s, 1H, OH), 8.09 (dd, *J* = 8.0 Hz, 1.2 Hz, 1H, CH), 7.87 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.79 (td, *J* = 7.0 Hz, 1.4 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.65 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.50 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, 2*H*_{ar}), 7.45 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, *H*_{ar}), 6.84 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, 2*H*_{ar}), 6.77 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, CH) ppm.

¹³C-NMR (DMSO- *d*₆, 100 MHz): δ 166.5 (C=O), 164.0 (*C*_{ar}), 156.7 (*C*_{ar}), 153.9 (*C*_{ar}), 143.2 (*C*_{ar}), 139.1 (*C*_{ar}), 138.3 (*C*_{ar}), 134.2 (2*C*_{ar}), 131.6 (*C*_{ar}), 130.8 (*C*_{ar}), 130.5 (*C*_{ar}), 125.6 (*C*_{ar}), 122.1 (*C*_{ar}), 120.7 (2*C*_{sp2}) ppm.

M.p.: decomposition at 345°C

LC/MS: *t*_R = 3.66 min.; *m/z*: 265.08 [M+H]⁺.

(E)-2-(4-((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)styryl)quinazolin-4(3H)-one (2)

$C_{22}H_{26}N_2O_2Si$
M.W.: 378.55 g/mol

To a solution of **1** (1.30 g, 4.90 mmol, 1.0 eq) in DMF (60 mL) was added imidazole (666 mg, 9.80 mmol, 2.0 eq) and TBSCl (1.12 g, 7.40 mmol, 1.5 eq) and the reaction mixture was stirred for 18h at room temperature under argon. It was then quenched with a saturated solution of ammonium chloride (100 mL), and the aqueous phase was extracted with diethyl ether (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum to afford **2** as a pale yellow gum (1.79 g, 97%).

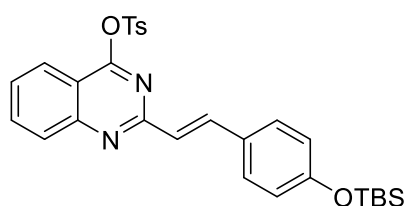
¹H-NMR (DMSO- *d*₆, 400 MHz): δ 11.50 (s, 1H, NH), 8.15 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, CH), 7.73 (d, *J* = 17.5 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.60 (m, 1H, *H*_{ar}), 7.38 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, 2*H*_{ar}), 7.30 (dt, *J* = 8.3 Hz, 6.9 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.10 (s, 1H, *H*_{ar}), 6.73 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2*H*_{ar}), 6.66 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H, CH), 0.82 (s, 9H, 3CH₃), 0.06 (s, 6H, 2CH₃) ppm.

¹³C-NMR (DMSO- *d*₆, 100 MHz): δ 166.2 (C=O), 161.2 (C_{ar}), 156.2 (C_{ar}), 153.6 (C_{ar}), 142.4 (C_{ar}), 139.0 (C_{ar}), 133.9 (2C_{ar}), 133.0 (C_{ar}), 131.5 (C_{ar}), 130.5 (C_{ar}), 130.4 (C_{ar}), 125.5 (C_{ar}), 125.0 (2C_{sp2}), 123.5 (C_{ar}), 30.0 (3CH₃), 22.5 (C), 0.0 (2CH₃) ppm.

M.p. : decomposition >345°C

LC/MS: *t*_R = 5.72 min.; *m/z*: 379.23 [M+H]⁺, 401.18 [M+Na]⁺

(*E*)-2-(4-((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)styryl)quinazolin-4-yl 4-méthylbenzenesulfonate
(3)



C₂₉H₃₂N₂O₄SSi
M.W.: 532.73 g/mol

To a solution of **2** (1.70 g, 4.50 mmol, 1.0 eq) in dry DCM (60 mL) were added 4-DMAP (55 mg, 0.45 mmol, 0.1 eq), TEA (1.21 mL, 9.00 mmol, 2.0 eq) and TsCl (1.71 g, 9.00 mmol, 2.0 eq). The reaction mixture was stirred under argon at room temperature for 24h. It was then quenched with water (50 mL) and the aqueous phase was extracted with DCM (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with brine (40 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum. The residue was diluted in Et₂O (10 mL) and the precipitate formed was filtered and rinsed with cold Et₂O (20 mL) to afford **3** as a pale yellow

solid (1.83 g, 77%).

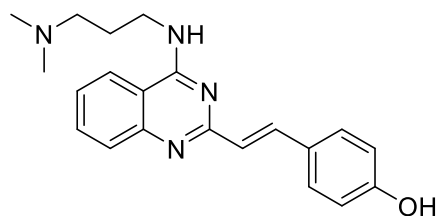
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 8.14 (m, 3H, 3*H*_{ar}), 7.88 (m, 3H, 3*H*_{ar}), 7.71 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H, *CH*), 7.58 (dt, *J* = 8.0 Hz, 7.4 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.49 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, 2*H*_{ar}), 7.42 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, 2*H*_{ar}), 7.12 (m, 1H, *CH*), 6.89 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, *H*_{ar}), 2.48 (s, 3H, *CH*₃), 1.00 (s, 9H, 3*CH*₃), 0.25 (s, 6H, 2*CH*₃) ppm.

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 188.5 (*C*-O), 161.5 (*C*_{ar}), 160.2 (*C*_{ar}), 157.1 (*C*_{ar}), 155.3 (*C*_{ar}), 153.3 (*C*_{ar}), 148.7 (*C*_{ar}), 139.4 (*C*_{ar}), 134.8 (*C*_{ar}), 134.4 (*C*_{ar}), 129.8 (2*C*_{ar}), 129.3 (*C*_{ar}), 129.1 (2*C*_{ar}), 127.7 (*C*_{ar}), 127.5 (*C*_{ar}), 124.9 (*C*_{ar}), 123.5 (*C*_{ar}), 120.5 (2*C*_{sp2}), 114.9 (*C*_{ar}), 25.7 (3*CH*₃), 21.8 (*C*), 18.2 (*CH*₃) -4.3 (2*CH*₃) ppm.

M.p.: 133-135°C

LC/MS: *t*_R = 7.26 min.; *m/z*: 533.57 [*M*+*H*]⁺, 555.54 [*M*+*Na*]⁺

(*E*)-4-(2-(4-((3-(diméthylamino)propyl)amino)quinazolin-2-yl)vinyl)phenol (4)



$C_{21}H_{24}N_4O$
M.W.: 348.45 g/mol

To a solution of **CP31398** (500 mg, 1.15 mmol, 1.0 eq) in NMP (15 mL) was added Na₂S (860 mg, 11.0 mmol, 10.0 eq). The mixture was stirred for 6h at 140 °C. The reaction mixture was then quenched with water (20 mL), and the aqueous layer was extracted with DCM (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum to afford **4** (300 mg, 75%) as a yellow solid.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 8.27 (br, 1H, *OH*), 8.15 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.83 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.71 (m, 1H, *H*_{ar}), 7.64 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.42 (m, 1H, *CH*), 7.24 (m, 1H, *NH*), 7.15 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, 2*H*_{ar}), 6.91 (d, *J* = 16 Hz, 1H, *CH*), 6.81 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, 2*H*_{ar}), 3.66 (m, 2H, *CH*₂), 2.66 (m, 2H, *CH*₂), 2.39 (s, 6H, 2*CH*₃), 1.92 (t, *J* = 9.0 Hz, 2H, *CH*₂) ppm.

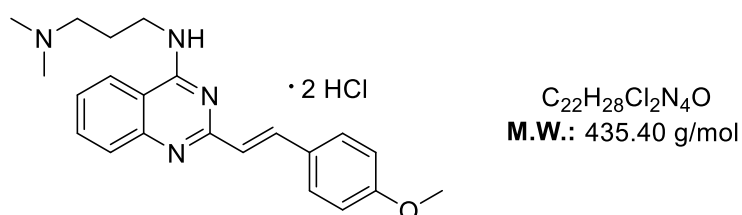
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 173.7 (*C*_{ar}), 160.4 (*C*_{ar}), 159.0 (*C*_{ar}), 158.2 (*C*_{ar}), 149.9

(C_{ar}), 136.1 (C_{ar}), 132.3 (C_{ar}), 128.9 (2C_{ar}), 127.3 (C_{ar}), 126.1 (C_{ar}), 124.7 (C_{ar}), 122.5 (C_{ar}), 115.7 (2C_{sp2}), 113.8 (C_{ar}), 57.1 (CH₂), 48.4 (CH₂), 45.1 (2CH₃), 26.3 (CH₂) ppm.

M.p.: 185-191°C

ESI-HRMS: m/z: 349.2023 [M+H]⁺ (calculated for C₂₁H₂₅N₄O : 349.2028)

(E)-N¹-(2-(4-methoxystyryl)quinazolin-4-yl)-N³,N³-diméthylpropane-1,3-diamine dihydrochloride CP31398



To a solution of **7** (600 mg, 2.16 mmol, 1.0 eq), in ACN (16 mL) were added BOP (1.90 g, 4.30 mmol, 2.0 eq) and DBU (653 μ L, 4.30 mmol, 1.3 eq). The reaction mixture was stirred during 10 min under argon at room temperature. Then, 3-(diméthylamino)-1-propylamine (690 μ L, 4.30 mmol, 2.0 eq) was added and the solution was stirred during 24h at room temperature under argon. The mixture was concentrated under vacuum. The residue was taken in DCM (20 mL). The organic phase was washed with water (2 x 20 mL), with brine (20 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum. Then HCl (4M in MeOH, 6 mL) was added followed by EtOAc (5 mL). The precipitate formed was filtered and washed with ACN (10 mL) to afford **CP31398** (840 mg, 92%) as a yellow solid.

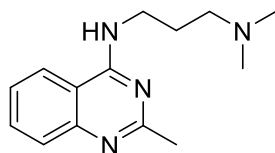
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 10.3 (br, 1H, NH), 8.60 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H_{ar}), 8.34 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, CH), 8.0 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, H_{ar}), 7.9 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H_{ar}), 7.79 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, 2 H_{ar}), 7.71 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H_{ar}), 7.19 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, CH), 7.09 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, 2 H_{ar}), 3.94 (q, $J = 6.0$ Hz, 2H, CH₂), 3.85 (s, 3H, CH₃), 3.24 (m, 2H, CH₂), 2.77 (s, 6H, 2CH₃), 2.17 (q, $J = 6.3$ Hz, 2H, CH₂) ppm.

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 161.7 (C_{ar}), 159.6 (C_{ar}), 156.4 (C_{ar}), 144.2 (C_{ar}), 135.6 (C_{ar}), 130.5 (2C_{ar}), 127.5 (C_{ar}), 126.8 (C_{ar}), 124.4 (C_{ar}), 118.9 (C_{ar}), 116.1 (C_{ar}), 114.7 (2C_{sp2}), 113.4 (C_{ar}), 112.4 (C_{ar}), 55.5 (CH₃), 54.3 (CH₂), 42.0 (2CH₃), 38.6 (CH₂), 23.5 (CH₂) ppm.

M.p.: 266-269 °C

LC/MS: $t_R = 3.26$ min.; m/z : 363.26 $[M+H]^+$ (without TFA).

***N*¹,*N*¹-diméthyl-*N*³-(2-méthylquinazolin-4-yl)propane-1,3-diamine (6)**



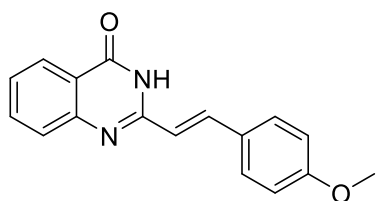
$C_{14}H_{20}N_4$
M.W.: 244,34 g/mol

To a solution of 2-méthyl-4(3*H*)-quinazolinone (1.0 g, 6.25 mmol, 1 eq) in ACN (25 mL) were added BOP (4.13 g, 9.34 mmol, 1.5 eq) and DBU (1.8 mL, 12.5 mmol, 2 eq). The mixture was stirred during 20 minutes at room temperature under argon. Then, 3-(diméthylamino)-1-propylamine (1.2 mL, 9.38 mmol, 1.5 eq) was added and the solution was stirred during 24h at room temperature under argon. The mixture was concentrated under vacuum. The residue was taken in DCM (50 mL). The organic phase was washed with water (2 x 50 mL), with brine (40 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified on silica gel chromatography using DCM/MeOH/Et₃N 9/1/0.1 v/v/v as eluent to afford the desired product **6** as a yellow oil (1.06 g, 70%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 8.34 (bs, 1H, NH), 8.17 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H_{ar}), 7.74 (ddd, $J = 8.3$ Hz, 6.9 Hz, 1.3 Hz, 1H, H_{ar}), 7.61 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H_{ar}), 7.46 (ddd, $J = 8.3$ Hz, 6.9 Hz, 1.3 Hz, 1H, H_{ar}), 3.60 (q, $J = 6.1$ Hz, 2H, CH₂), 3.09 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, CH₂), 2.76 (s, 6H, 2CH₃), 2.48 (s, 3H, CH₃), 1.97 (q, $J = 7.8$ Hz, 2H, CH₂) ppm.

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 163.1 (C_{ar}), 159.5 (C_{ar}), 149.2 (C_{ar}), 132.5 (C_{ar}), 126.6 (C_{ar}), 124.8 (C_{ar}), 122.6 (C_{ar}), 112.9 (C_{ar}), 55.0 (CH₂), 42.4 (2CH₃), 37.6 (CH₂), 26.2 (CH₂), 24.2 (CH₃) ppm.

LC/MS: $t_R = 3.78$ min.; m/z : 279.42 $[M+H]^+$

(E)-2-(4-methoxystyryl)quinazolin-4(3H)-one (7)

$C_{17}H_{14}N_2O_2$
M.W.: 278.31 g/mol

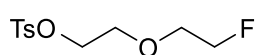
To a solution of 2-méthyl-4(3*H*)-quinazolinone (800 mg, 5.0 mmol, 1.0 eq) in AcOH (15 mL) were added potassium acetate (980.0 mg, 10.0 mmol, 2.0 eq) and 4-methoxybenzaldehyde (1.2 mL, 10.0 mmol, 2.0 eq). The mixture was stirred 24h at 120°C. After cooling to room temperature iced-water (20 mL) was added and the precipitate formed was filtered and washed with iced-water (10 mL) to afford **7** (1.04 g, 75%) as a brown powder.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 12.29 (s, 1H, *NH*), 8.09 (dd, *J* = 7.6 Hz, 1.2 Hz, 1H, *CH*), 7.90 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.79 (td, *J* = 7.1 Hz, 1.6 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.63 (m, 3H, 3*H*_{ar}), 7.45 (td, *J* = 7.1 Hz, 1.2 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.03 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, 2*H*_{ar}), 6.87 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H, *CH*), 3.82 (s, 3H, *CH*₃) ppm.

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 162.1 (*C*=O), 160.5 (*C*_{ar}), 152.1 (*C*_{ar}), 149.1 (*C*_{ar}), 137.9 (*C*_{ar}), 134.3 (*C*_{ar}), 129.2 (2*C*_{ar}), 127.7 (*C*_{ar}), 126.8 (*C*_{ar}), 125.8 (*C*_{sp2}), 125.7 (*C*_{sp2}), 121.0 (*C*_{ar}), 118.8 (*C*_{ar}), 114.5 (2*C*_{ar}), 55.3 (*CH*₃) ppm.

M.p.: 295-298 °C

LC/MS: *t*_R = 3.78 min.; *m/z*: 279.42 [*M*+*H*]⁺

2-(2-fluoroethoxy)ethyl 4-méthylbenzenesulfonate (8)

$C_{11}H_{15}FO_4S$
M.W.: 262.30 g/mol

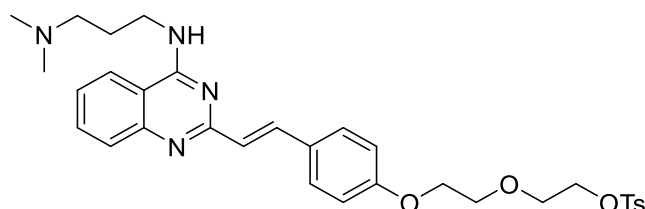
To a solution of diethylene glycol ditosylate (500 mg, 1.2 mmol, 1.0 eq) in tetrahydrofurane (20 mL), was added a 1 M tetra-*n*-butylammonium fluoride in tetrahydrofurane solution (3.6 mL, 3.6 mmol, 3.0 eq). The reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h. The volatiles were removed under vacuum. The residue was partitioned between water (20 mL) and ethyl acetate (20 mL). The aqueous layer was separated, and extracted thrice with ethyl acetate

(3 x 40 mL). The combined organic layers were washed with brine (50 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The residue was purified on silica gel chromatography (EtOAc/heptane 3/7) to afford **8** (87 mg, 20%) as a colorless oil.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.79 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.33 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 4.47 (dt, 2H, *J*_{H-F} = 44.4 Hz, *J* = 4.4 Hz), 4.16 (t, 2H, *J* = 4.8 Hz), 3.71 (t, 2H, *J* = 4.8 Hz), 3.66 (dt, 2H, *J* = 24.4 Hz, 4.4 Hz), 2.43 (s, 3H).

Data were in accordance with the literature.²⁴⁷

(*E*)-2-(2-(4-(2-(4-((3-(diméthylamino)propyl)amino)quinazolin-2-yl)vinyl)phenoxy)ethoxy)ethyl 4-méthylbenzenesulfonate (9**)**



C₃₂H₃₈N₄O₅S
M.W.: 590.74 g/mol

To a solution of **4** (55 mg, 0.16 mmol, 1.0 eq) in ACN (3 mL) were added Cs₂CO₃ (104 mg, 0.32 mmol, 2.0 eq) and diethylene glycol di(*p*-toluenesulfonate) (133 mg, 0.32 mmol, 2.0 eq). The resulting solution was stirred 24h at room temperature under argon. The reaction mixture was then concentrated to dryness, and the residue was dissolved in DCM (5 mL). The organic phase was washed with water (2 x 15 mL) and brine (15 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by chromatography using DCM/MeOH/NH₄OH 95/5/0.1 v/v/v as eluent to afford **9** (48 mg, 50%) as a yellow oil.

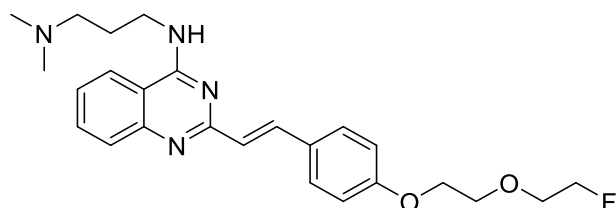
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 8.27 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, NH), 8.15 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.87 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H, CH), 7.79 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 2*H*_{ar}), 7.72 (ddd, *J* = 15.3 Hz, 8.3 Hz, 1.3 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.65 (m, 3H, 3*H*_{ar}), 7.45 (m, 3H, 3*H*_{ar}), 6.99 (m, 3H, CH + 2*H*_{ar}), 4.16 (t, *J* = 4.3 Hz, 2H, CH₂), 4.07 (m, 2H, CH₂), 3.68 (m, 6H, 3CH₂), 2.39 (s, 3H, CH₃), 2.33 (m, 2H, CH₂), 1.99 (s, 6H, 2CH₃), 1.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂) ppm.

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 160.2 (*C*_{ar}), 159.0 (*C*_{ar}), 150.0 (*C*_{ar}), 145.7 (*C*_{ar}), 137.6 (*C*_{ar}), 135.7 (*C*_{ar}), 132.4 (*C*_{ar}), 132.3 (*C*_{ar}), 130.1 (*C*_{ar}), 128.8 (2*C*_{ar}), 128.0 (2*C*_{ar}), 127.6 (*C*_{ar}), 127.4 (*C*_{ar}), 127.1 (*C*_{ar}), 125.5 (2*C*_{sp2}), 122.5 (*C*_{ar}), 114.8 (2*C*_{ar}), 113.8 (*C*_{ar}), 70.0 (CH₂), 68.8

(CH₂), 68.0 (CH₂), 67.1 (CH₂), 56.5 (CH₂), 50.9 (CH₂), 44.4 (2CH₃), 25.8 (CH₂), 20.7 (CH₃).

ESI-HRMS: m/z: 591.2626 [M+H]⁺ (calculated for C₃₂H₃₉N₄O₅S : 591.2641)

(E)-N¹-(2-(4-(2-(2-fluoroethoxy)ethoxy)styryl)quinazolin-4-yl)-N³,N³-diméthylpropane-1,3-diamine PEG-CP31398



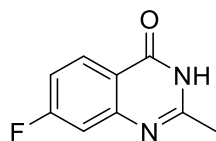
C₂₅H₃₁FN₄O₂
M.W.: 438.55 g/mol

To a solution of **4** (30 mg, 0.09 mmol, 1.0 eq) in ACN (3 mL) were added Cs₂CO₃ (60 mg, 0.18 mmol, 2.0 eq) and **8** (47 mg, 0.18 mmol, 2.0 eq). The resulting solution was stirred for 24h at room temperature under argon. The reaction mixture was then concentrated to dryness, and the residue was dissolved in DCM (5 mL). The organic phase was washed with water (2 x 10 mL) and brine (10 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by chromatography using DCM/MeOH 9/1 v/v as eluent to afford **PEG-CP31398** (22 mg, 50%) as a yellow oil.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 8.30 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, *NH*), 8.17 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.88 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, *CH*), 7.66 (m, 3H, 3*H*_{ar}), 7.49 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.12 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.01 (m, 3H, *CH* + 2*H*_{ar}), 4.57 (td, *J*_{H-F} = 48.0 Hz, *J* = 4.1 Hz, 2H, *CH*₂), 4.17 (m, 2H, *CH*₂), 3.82-3.68 (m, 6H, 3*CH*₂), 2.93 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, *CH*₂), 2.60 (s, 6H, 2*CH*₃), 2.0 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H, *CH*₂) ppm.

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 160.3 (*C*), 159.0 (*C*), 158.9 (*C*), 149.9 (*C*), 135.6 (*C*), 132.4 (*C*), 128.9 (2*C*_{ar}), 128.5 (*C*), 127.3 (*C*), 127.1 (*C*), 124.8 (*C*_{sp2}), 122.5 (*C*_{sp2}), 114.9 (2*C*_{ar}), 113.9 (*C*_{ar}), 83.0 (d, *J*_{C-F} = 165 Hz, *CH*₂), 69.8 (d, *J*_{C-F} = 19 Hz, *CH*₂), 68.9 (*CH*₂), 67.2 (*CH*₂), 57.1 (*CH*₂), 45.1 (2*CH*₃), 39.1 (*CH*₂), 26.4 (*CH*₂) ppm.

ESI-HRMS: 439.2505 [M+H]⁺ (calculated for C₂₅H₃₂FN₄O₂ : 439.2509)

7-fluoro-2-méthylquinazolin-4(3H)-one (10)

$C_9H_7FN_2O$
M.W.: 178.17 g/mol

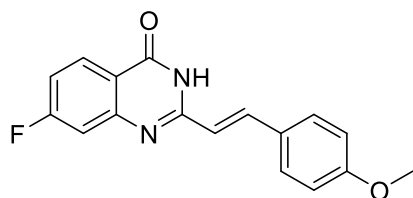
Acetic anhydride (1.5 mL, 14.7 mmol, 9.0 eq) was added on 2-amino-4-fluorobenzoic acid (250 mg, 1.61 mmol, 1.0 eq) and the mixture was stirred at 120°C during 3h. After cooling to room temperature, the mixture was concentrated under vacuum and an ammonia solution (28% v/v, 3 mL) was added. The mixture was stirred at 120°C during 4h. The precipitate formed was filtered under vacuum and washed with cold water (15 mL) to afford **10** as a light brown solid (190 mg, 66%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 12.12 (s, 1H, NH), 8.12 (dd, *J* = 8.9 Hz, 6.4 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.31 (m, 2H, 2*H*_{ar}), 2.35 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 165.6 (d, *J* = 250 Hz, *C*_{ar}), 161.0 (*C*_{ar}), 155.9 (*C*_{ar}), 151.1 (d, *J* = 13 Hz, *C*_{ar}), 128.7 (d, *J* = 12 Hz, *C*_{ar}), 117.6 (d, *J* = 2 Hz, *C*_{ar}), 114.3 (d, *J* = 24 Hz, *C*_{ar}), 111.6 (d, *J* = 22 Hz, *C*_{ar}), 21.4 (CH₃) ppm.

M.p.: 280-285°C

LC/MS: *t*_R = 3.42 min.; *m/z*: 179.02 [M+H]⁺.

(E)-7-fluoro-2-(4-methoxystyryl)quinazolin-4(3H)-one (11)

$C_{17}H_{13}FN_2O_2$
M.W.: 296.30 g/mol

To a solution of **10** (165 mg, 0.93 mmol, 1.0 eq) in AcOH (4 mL) in a dry tube were added dry AcOK (230 mg, 2.80 mmol, 3 eq) and *p*-methoxybenzaldehyde (283 μL, 2.33 mmol, 2.5 eq). The tube was sealed and the reaction was heated at 110°C during 24h. The solution was cooled in an ice bath and the precipitate formed was filtered and washed with cold ethanol (5 mL) to afford **11** (150 mg, 55 %) as a brown powder.

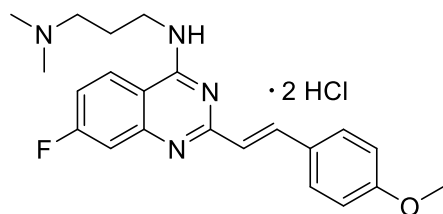
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 12.35 (s, 1H, NH), 8.15 (dd, *J* = 8.8, 6.4 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.92 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, CH), 7.62 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, 2*H*_{ar}), 7.40 (dd, *J* = 10.2 Hz, 2.5 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.32 (td, *J* = 8.8 Hz, 2.5 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.04 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, 2*H*_{ar}), 6.85 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, CH), 3.82 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 164.4 (*C*_{ar}), 161.5 (*C*_{ar}), 160.7 (*C*_{ar}), 153.6 (*C*_{ar}), 151.3 (*C*_{ar}), 138.6 (*C*_{ar}), 129.3 (2*C*_{ar}), 128.9 (*C*_{ar}), 127.5 (*C*_{ar}), 118.5 (*C*_{ar}), 118.0 (2*C*_{sp2}), 114.5 (2*C*_{ar}), 111.8 (*C*_{ar}), 55.3 (CH₃) ppm.

M.p.: 285-288°C

LC/MS: t_R = 4.43 min.; m/z: 297.04 [M+H]⁺.

(*E*)-*N*¹-(7-fluoro-2-(4-methoxystyryl)quinazolin-4-yl)-*N*³,*N*³-diméthylpropane-1,3-diamine dihydrochloride F-CP31398



C₂₂H₂₇Cl₂FN₄O
M.W.: 453.39 g/mol

To a solution of **11** (130 mg, 0.44 mmol, 1.0 eq), in ACN (2.5 mL) were added BOP (234 mg, 0.53 mmol, 1.2 eq) and DBU (80 μL, 0.53 mmol, 1.2 eq). The reaction mixture was stirred during 10 min under argon at room temperature and 3-(diméthylamino)-1-propylamine (73 μL, 0.57 mmol, 1.5 eq) was added. The solution was stirred during 24h at room temperature under argon. The mixture was concentrated to dryness and HCl (1.25 M in MeOH, 2 mL) was added followed by EtOAc (5 mL) and the precipitate formed was filtered and washed with cold ACN (5 mL) to afford **F-CP31398** (185 mg, 90%) as a yellow solid.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 8.55 (dd, *J* = 9.0, 5.8 Hz, 1H, *H*_{ar}), 8.16 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, CH), 8.0 (td, *J* = 8.4 Hz, 0.8 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.73 (m, 2H, 2*H*_{ar}), 7.53 (m, 2H, 2*H*_{ar}), 7.07 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, CH), 7.03 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, 2*H*_{ar}), 3.83 (m, 5H, CH₂ + CH₃), 3.22 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂), 2.76 (s, 6H, 2CH₃), 2.14 (q, *J* = 7.4, 2H, CH₂) ppm.

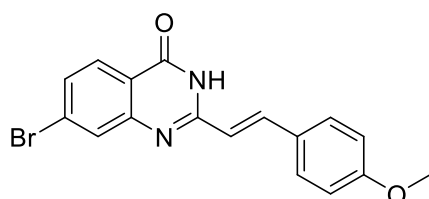
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 166.2 (*C*_{ar}), 163.7 (*C*_{ar}), 161.0 (*C*_{ar}), 159.0 (2*C*_{ar}), 142.8 (*C*_{ar}), 129.9 (2*C*_{ar}), 127.5 (*C*_{ar}), 127.3 (*C*_{ar}), 124.4 (*C*_{ar}), 119.1 (*C*_{ar}), 114.5 (2*C*_{sp2}), 110.1 (*C*_{ar}),

109.6 (C_{ar}), 55.3 (CH_3), 54.4 (CH_2), 53.4 (CH_2), 42.0 ($2CH_3$), 23.6 (CH_2) ppm.

M.p.: 190-200°C

ESI-HRMS: m/z: 381.2087 $[M+H]^+$ (calculated for $C_{22}H_{26}FN_4O$: 381.2091)

(E)-7-bromo-2-(4-methoxystyryl)quinazolin-4(3H)-one (12)



$C_{17}H_{13}BrN_2O_2$
M.W.: 357.21 g/mol

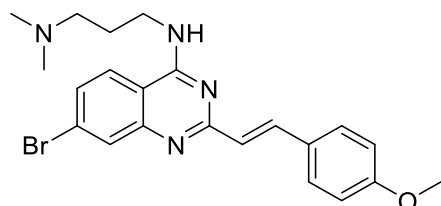
To a solution of 7-bromo-2-méthylquinazolin-4(3H)-one (400 mg, 1.67 mmol, 1.0 eq) in AcOH (8 mL) in were added dry AcOK (410 mg, 5.00 mmol, 3 eq) and *p*-methoxybenzaldehyde (0.5 mL, 4.18 mmol, 2.5 eq). The reaction was heated at 110°C in a sealed tube during 24h. The solution was cooled in an ice bath and the precipitate formed was filtered and rinsed with cold ethanol (10 mL) to afford **12** (445 mg, 75 %) as a white powder.

1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 7.98 (dd, $J = 8.5$ Hz, 2.2 Hz, 1H, CH), 7.90 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H, H_{ar}), 7.80 (m, 1H, H_{ar}), 7.59 (m, 3H, $2H_{ar}/CH$), 7.02 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, $2H_{ar}$), 6.84 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H, H_{ar}), 3.81 (s, 3H, CH_3) ppm.

^{13}C -NMR could not be performed because of the insolubility of the product

M.p.: 215-220°C

LC/MS: $t_R = 4.82$ min.; m/z: 359.77 $[M+H]^+$.

(E)-N¹-(7-bromo-2-(4-methoxystyryl)quinazolin-4-yl)-N³,N³-diméthylpropane-1,3-diamine (13)

C₂₂H₂₅BrN₄O
M.W.: 441.37 g/mol

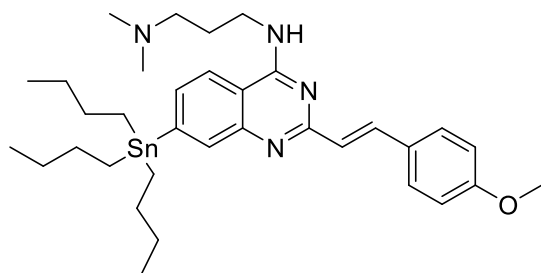
To a solution of **12** (445 mg, 1.25 mmol, 1.0 eq), in ACN (8 mL) were added BOP (720 mg, 1.63 mmol, 1.3 eq) and DBU (248 μ L, 1.63 mmol, 1.3 eq). The reaction mixture was stirred during 10 min under argon at room temperature. Then, 3-(diméthylamino)-1-propylamine (243 μ L, 1.90 mmol, 1.5 eq) was added and the solution was stirred during 24h at room temperature under argon. The precipitate formed was filtered and washed with ACN (10 mL) to afford **13** (280 mg, 51%) as a white solid.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 8.40 (br, 1H, NH), 8.12 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, CH), 7.87 (m, 2H, 2CH_{ar}), 7.64 (m, 3H, 2H_{ar}/CH), 6.99 (m, 3H, 3H_{ar}), 3.80 (s, 3H, CH₃), 3.69 (dd, *J* = 12.3 Hz, 6.4, Hz, 2H, CH₂), 3.10 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂), 2.73 (s, 6H, 2CH₃), 2.03 (m, 2H, CH₂) ppm.

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 161.4 (C), 159.9 (C), 158.9 (C), 151.2 (C), 136.5 (C), 129.2 (C), 129.0 (2C_{ar}), 128.5 (C), 127.7 (C), 126.6 (C), 125.9 (C), 124.8 (C), 114.3 (2C_{ar}), 112.8 (C_{ar}), 57.0 (CH₃), 55.2 (CH₂), 45.2 (2CH₃), 40.1 (CH₂), 26.4 (CH₂) ppm.

M.p.: 145-151°C

LC/MS: t_R = 5.48 min.; m/z: 443.13 [M+H]⁺

(E)-N¹-(2-(4-methoxystyryl)-7-(tributylstannyl)quinazolin-4-yl)-N³,N³-diméthylpropane-1,3-diamine (16)

C₃₄H₅₂N₄OSn
 M.W.: 651.53 g/mol

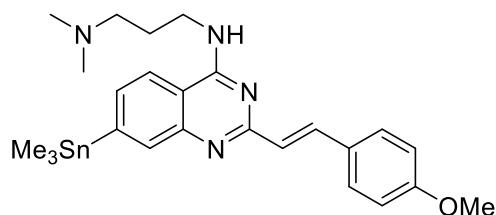
To a flame dried tube was added **13** (200 mg, 0.45 mmol, 1.0 eq) and dioxane (4 mL). The mixture was degassed during 10 min and tetrakis(triphenylphosphine) palladium (52 mg, 0.05 mmol, 0.1 eq) and hexabutylditin (680 μ L, 1.35 mmol, 3.0 eq) were added. The mixture was stirred at 110 °C during 6h. Upon cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated under vacuum and the residue was purified on silica gel chromatography using DCM/MeOH/NH₄OH 9/1/0.1 v/v/v as eluent to afford **16** (186 mg, 63%) as a yellow gum.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 8.27 (br, 1H, NH), 8.09 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H_{ar}), 7.87 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, CH), 7.74 (s, 1H, H_{ar}), 7.66 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, $2H_{ar}$), 7.50 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H_{ar}), 7.0 (m, 3H, $2H_{ar} + CH$), 3.81 (s, 3H, CH₃), 3.70 (q, $J = 6.1$ Hz, 2H, CH₂), 3.03 (m, 2H, CH₂), 2.69 (s, 6H, 2CH₃), 2.03 (q, $J = 6.1$ Hz, 2H, CH₂), 1.55 (m, 6H, 3CH₂), 1.32 (m, 6H, 3CH₂), 1.13 (m, $J_{Sn-H} = 26$ Hz, 6H, 3CH₂), 0.86 (t, $J = 7.4$ Hz, 9H, 3CH₃) ppm.

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 163.1 (C_{ar}), 159.5 (C_{ar}), 159.1 (C_{ar}), 148.9 (C_{ar}), 147.9 (C_{ar}), 135.4 (C_{ar}), 134.6 (C_{ar}), 128.8 (3 C_{ar}), 128.7 (C_{ar}), 127.0 (C_{ar}), 121.3 (C_{ar}), 114.3 (2 C_{ar}), 113.6 (C_{ar}), 56.3 (CH₂), 55.2 (CH₃), 44.0 (2CH₃), 38.4 (CH₂), 28.7 (3CH₂), 26.9 (3CH₂), 25.4 (CH₂), 15.9 (3CH₂), -9.1 (3CH₃) ppm.

LC/MS: $t_R = 5.80$ min.; m/z : 652.42 [M+H]⁺.

(E)-N¹-(2-(4-methoxystyryl)-7-(triméthylstannyl)quinazolin-4-yl)-N¹,N¹-diméthylpropane-1,3-diamine (17)



$C_{25}H_{34}N_4OSn$
M.W.: 525.28 g/mol

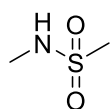
To a flame dried tube was added **13** (100 mg, 0.23 mmol, 1.0 eq) and dioxane (1 mL). The mixture was degassed during 10 min and tetrakis(triphenylphosphine) palladium (12 mg, 0.02 mmol, 0.1 eq) and hexaméthylditin (96 μ L, 0.46 mmol, 2.0 eq) were added. The mixture was stirred at 110 °C during 15h. Upon cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated under vacuum and the residue was purified on flash chromatography using DCM/MeOH/NH₄OH 9/1/0.1 v/v/v as eluent to afford **17** (86 mg, 69%) as a yellow solid.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 8.23 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H, NH), 8.06 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_{ar}), 7.85 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, CH), 7.76 (s, 1H, H_{ar}), 7.62 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, $2H_{ar}$), 7.53 (dd, $J = 8.1$ Hz, 1.0 Hz, 1H, H_{ar}), 7.0 (m, 3H, $2H_{ar} + CH$), 3.81 (s, 3H, CH_3), 3.66 (q, $J = 6.6$ Hz, 2H, CH_2), 2.37 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2), 2.19 (s, 6H, $2CH_3$), 1.84 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2), 0.34 (s, $J_{Sn-H} = 27$ Hz, 9H, $3CH_3$) ppm.

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 160.1 (C_{ar}), 159.8 (C_{ar}), 159.1 (C_{ar}), 148.9 (C_{ar}), 148.3 (C_{ar}), 135.6 (C_{ar}), 135.0 (C_{ar}), 128.8 ($3C_{ar}$), 128.7 (C_{ar}), 127.0 (C_{ar}), 121.3 (C_{ar}), 114.3 ($2C_{ar}$), 113.6 (C_{ar}), 56.3 (CH_2), 55.2 (CH_3), 44.0 ($2CH_3$), 38.4 (CH_2), 25.4 (CH_2), -9.3 ($3CH_3$) ppm.

ESI-HRMS: m/z : 527.1828 [$M+H$]⁺ (calculated for $C_{25}H_{35}N_4OSn$: 527.1828)

***N*-méthylmethanesulfonamide (18)**



$C_2H_7NO_2S$
M.W.: 109.14 g/mol

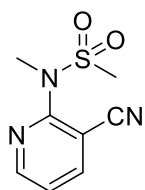
To a solution of *N*-méthylamine in water (40% w/v, 129 mmol, 10 mL) at 0°C was added MsCl dropwise over 30 min and the mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was diluted with DCM (20 mL) and the phases were separated. The aqueous layer was extracted with DCM (2 x 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over sodium sulfate and concentrated under vacuum to afford **18** (2.18 g, 26 %) as a colorless

oil.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 3.68 (s, 1H, NH), 2.94 (s, 3H, CH₃), 2.82 (s, 3H, CH₃) ppm.

Data were in accordance with litterature¹⁰⁵.

***N*-(3-cyanopyridin-2-yl)-*N*-méthylmethanesulfonamide (19)**



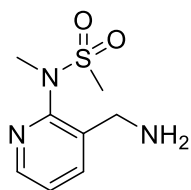
C₈H₉N₃O₂S
M.W.: 211.24 g/mol

To a solution of potassium carbonate (1.0 g, 7.2 mmol, 2.0 eq) in DMF (15 mL) was added **18** (470 mg, 4.3 mmol, 1.2 eq) and the mixture was stirred 10min at room temperature. 2-chloronicotinonitrile (500 mg, 3.6 mmol, 1.0 eq) was added portionwise and the mixture was stirred 24h at 90°C in a sealed tube. After cooling to room temperature, the mixture was concentrated under vacuum. The residue was partitioned between EtOAc (25 mL) and water (25 mL). The organic phase was separated, and the aqueous layer was extracted with EtOAc (2 x 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (15 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum. The crude was purified by chromatography using cyclohexane/EtOAc 1/1 v/v as eluent to afford **19** as a yellow oil (311 mg, 41 %)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.66 (dd, *J* = 5.0 Hz, 2.0 Hz, 1H, *H_{ar}*), 8.06 (dd, *J* = 7.9 Hz, 1.9 Hz, 1H, *H_{ar}*), 7.39 (dd, *J* = 7.9 Hz, 4.9 Hz, 1H, *H_{ar}*) 3.40 (s, 3H, CH₃), 3.20 (s, 3H, CH₃) ppm.

LC/MS: t_R = 3.66 min.; m/z: 212.04 [M+H]⁺.

Data were in accordance with the litterature¹⁰⁵.

***N*-(3-(aminométhyl)pyridin-2-yl)-*N*-méthylmethanesulfonamide (20)**

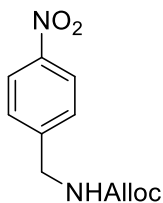
$C_8H_{13}N_3O_2S$
M.W.: 215.27 g/mol

To a solution of **19** (300 mg, 1.4 mmol, 1.0 eq) in an 7 M solution of ammonia in MeOH (17 mL) were added Pd/C 10 % (60 mg, 0.06 mmol, 0.1 eq) and the mixture was stirred under H_2 (1 atm) at room temperature overnight. The reaction mixture was then filtered over celite and the filtrate was concentrated under vacuum to afford **20** (291 mg, 95 %) as a colorless oil.

1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8.38 (dd, $J = 4.8$ Hz, 1.8 Hz, 1H, H_{ar}), 7.92 (dd, $J = 7.9$ Hz, 1.9 Hz, 1H, H_{ar}), 7.32 (dd, $J = 7.8$ Hz, 4.8 Hz, 1H, H_{ar}), 4.04 (s, 2H, CH_2), 3.26 (s, 3H, CH_3), 3.08 (s, 3H, CH_3) ppm.

LC/MS: $t_R = 1.13$ min.; m/z : 216.01 $[M+H]^+$.

Data were in accordance with litterature¹⁰⁵

allyl (4-nitrobenzyl)carbamate (21)

$C_{11}H_{12}N_2O_4$
M.W.: 236.23 g/mol

To a solution of 4-nitrophenylmethanamine hydrochloride (800 mg, 4.23 mmol, 1.0 eq) in a mixture of EtOAc and water (1/1 v/v, 20 mL) were added potassium carbonate (1.75g, 12.70 mmol, 3.0 eq) and allylchloroformate (544 μ L, 5.10 mmol, 1.2 eq). The mixture was stirred for 20h at room temperature. The phases were separated and the aqueous phase was extracted with EtOAc (3 x 15 mL). The combined organic phases were washed with brine (20 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum to afford **21** (985 mg, 99 %) as a white powder.

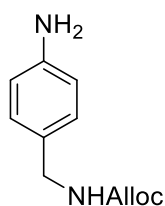
1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8.20 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, $2H_{ar}$), 7.46 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, $2H_{ar}$),

5.93 (m, 1H, CH), 5.27 (m, 3H, CH₂/NH), 4.61 (td, $J = 5.8$ Hz, 1.5 Hz, 2H, CH₂), 4.48 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H, CH₂) ppm.

LC/MS: $t_R = 1.13$ min.; m/z : 216.01 [M+H]⁺.

Data were in accordance with the literature¹⁰⁵

allyl (4-aminobenzyl)carbamate (**22**)



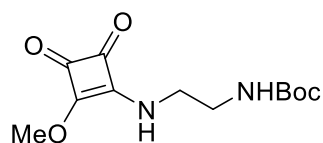
C₁₁H₁₄N₂O₂
M.W.: 206.25 g/mol

To a solution of **21** (500 mg, 2.12 mmol, 1.0 eq) in EtOH (13 mL) was added SnCl₂ (3.8g, 16.95 mmol, 8.0 eq) and the mixture was stirred at reflux for 3h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was poured into 150 mL of water, and a 2M solution of NaOH (10 mL) was added until pH 14 was reached. The solution was filtered through celite and the filtrate was extracted with ethyl acetate (3 x 25 mL). The combined organic layers were washed with brine (30 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by chromatography using cyclohexane/EtOAc 6/4 v/v to afford **22** (333 mg, 77 %) as a yellow oil.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.08 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, 2H_{ar}), 6.64 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, 2H_{ar}), 5.93 (td, $J = 10.7$ Hz, 5.6 Hz, 1H, CH), 5.30 (qd, $J = 17.1$ Hz, 1.5 Hz, 1H, CH), 5.20 (qd, $J = 10.2$ Hz, 1.3 Hz, 1H, CH), 4.91 (br, 1H, NH), 4.58 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H, CH₂), 4.25 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H, CH₂), 3.66 (br, 2H, NH₂) ppm.

LC/MS: $t_R = 3.23$ min.; m/z : 207.23 [M+H]⁺.

Data were in accordance with the literature¹⁰⁵.

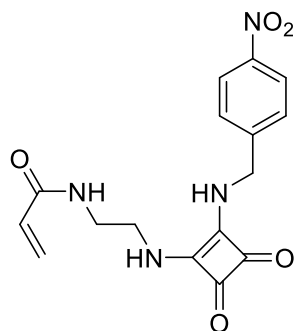
***tert*-butyl (2-((2-methoxy-3,4-dioxocyclobut-1-en-1-yl)amino)ethyl)carbamate (23)**

$C_{12}H_{18}N_2O_5$
M.W.: 270.29 g/mol

To a solution of 3,4-dimethoxycyclobut-3-ene-1,2-dione (978 mg, 6.88 mmol, 1.1 eq) in MeOH (8 mL), was added a solution of *tert*-butyl (2-aminoethyl)carbamate (1.0 g, 6.25 mmol, 1.0 eq) in MeOH (2 mL) dropwise. The mixture was stirred overnight at room temperature under argon and concentrated under vacuum. The crude was purified by chromatography using DCM/MeOH 98/2 v/v as eluent to afford **23** (1.0 g, 60 %) as a colorless oil.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 4.87 (s, 1H, NH), 4.40 (s, 3H, CH₃), 3.78 (s, 1H, CH₂), 3.54 (s, 1H, CH₂), 3.35 (q, *J* = 5.2 Hz, 2H, CH₂), 1.43 (s, 9H, 3CH₃) ppm.

Data were in accordance with the literature¹⁰⁵.

***N*-(2-((2-((4-nitrobenzyl)amino)-3,4-dioxocyclobut-1-en-1-yl)amino)ethyl)acrylamide (24)**

$C_{16}H_{16}N_4O_5$
M.W.: 344.33 g/mol

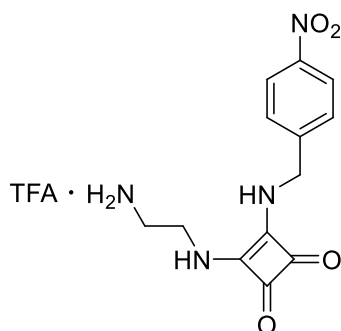
To a solution of **25** (50 mg, 0.12 mmol, 1.0 eq) in DMF (800 μL) at 0°C were added DIPEA (63 μL, 0.36 mmol, 3.0 eq) and acryloyl chloride (13 μL, 0.16 mmol, 1.3 eq) under argon. The solution was allowed to warm at room temperature and stirred overnight. The mixture was then concentrated, the residue was partitioned between water (5mL) and DCM (5 mL). The aqueous layer was extracted with DCM (3 x 5 mL), and the combined organic layers were washed with an aqueous solution of LiCl (5% w/v, 10 mL) and brine (10 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated. The residue was purified by chromatography using DCM/MeOH (95/5 v/v) as eluent to afford **24** (17 mg, 41%) as a brown oil.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 8.24 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, 2*H_{ar}*), 7.60 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, 2*H_{ar}*), 7.53 (br, 1H, NH), 6.20 (dd, *J* = 17.1 Hz, 9.9 Hz, 1H, CH), 6.08 (dd, *J* = 17.1 Hz, 2.3 Hz, 1H, CH₂), 5.59 (dd, *J* = 10.3 Hz, 9.9 Hz, 1H, CH₂), 4.85 (m, 2H, CH₂), 3.58 (m, 2H, CH₂), 3.32 (m, 2H, CH₂) ppm.

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 182.8 (C), 182.5 (C), 168.3 (C), 165.0 (C_{ar}), 147.0 (2C_{ar}), 146.7 (C_{ar}), 131.5 (C_{sp2}), 128.4 (2C_{ar}), 125.3 (C_{sp2}), 123.7 (2C_{sp2}), 48.6 (CH₂), 46.0 (CH₂), 42.9 (CH₂) ppm.

LC/MS: t_R = 3.54 min.; m/z: 345.16 [M+H]⁺.

3-((2-aminoethyl)amino)-4-((4-nitrobenzyl)amino)cyclobut-3-ene-1,2-dione (25)



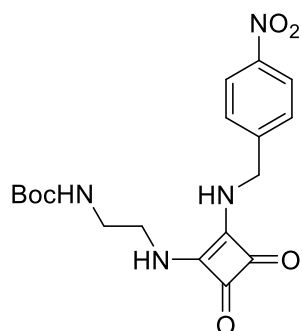
C₁₅H₁₅F₃N₄O₆
M.W.: 404.30 g/mol

To a solution of **26** (300 mg, 0.77 mmol, 1.0 eq) in DCM (3 mL) at 0°C was added TFA (2 mL) dropwise. The mixture was stirred 2h at room temperature. The mixture was then concentrated, the residue was diluted in Et₂O (5 mL) and the precipitate formed was filtered to afford **25** as a TFA salt (120 mg, 43%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 8.29 (br, 1H, NH), 8.24 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, 2*H_{ar}*), 7.83 (m, 5H, 2NH, 1NH₃), 7.60 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, 2*H_{ar}*), 4.85 (m, 2H, CH₂), 3.71 (q, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂), 3.02 (q, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂) ppm.

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 182.8 (2C), 158.5 (C_{ar}), 158.2 (C_{ar}), 146.9 (C_{ar}), 146.7 (C_{ar}), 128.5 (2C_{ar}), 123.8 (2C_{sp2}), 46.0 (CH₂), 45.6 (CH₂), 41.0 (CH₂) ppm.

LC/MS: t_R = 3.20 min.; m/z: 291.09 [M+H]⁺ (without TFA)

tert-butyl-(2-((2-((4-nitrobenzyl)amino)-3,4-dioxocyclobut-1-en-1-yl)amino)ethyl)carbamate (26)

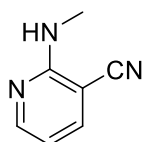
$C_{18}H_{22}N_4O_6$
M.W.: 390.40 g/mol

To a solution of nitrobenzylamine hydrochloride (600 mg, 2.2 mmol, 1.0 eq) in DMF (2 mL) were added **23** (500 mg, 2.67 mmol, 1.2 eq) and DIPEA (1 mL, 5.6 mmol, 2.5 eq). The solution was stirred at 75°C overnight under argon. After cooling to room temperature, the mixture was concentrated under vacuum and the residue was purified by chromatography using DCM/MeOH (98/2 v/v) to afford **26** (430 mg, 51%) as a yellow solid.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 10.60 (br, 2H, 2NH), 8.24 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, 2H_{ar}), 7.60 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, 2H_{ar}), 6.90, (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, NH), 4.85 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H, CH₂), 3.50 (br, 2H, CH₂), 3.10 (q, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂), 1.35 (s, 9H, 3CH₃) ppm.

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 182.5 (2C), 168.3 (C), 155.7 (2C_{ar}), 147.0 (C_{ar}), 146.7 (C_{ar}), 128.5 (2C_{sp2}), 123.8 (2C_{ar}), 77.8 (C), 46.0 (CH₂), 43.3 (CH₂), 41.1 (CH₂), 28.1 (3CH₃) ppm.

LC/MS: t_R = 3.90 min.; m/z: 391.19 [M+H]⁺.

2-(méthylamino)nicotinonitrile (27)

$C_7H_7N_3$
M.W.: 133.15 g/mol

To 2-chloronicotinonitrile (500 mg, 3.6 mmol, 1.0 eq) was added a solution of *N*-méthylamine in water (40% wt/v, 5mL, 58.5 mmol, 16.0 eq). The solution was stirred 2h at 80°C. After cooling to room temperature, the precipitate formed was filtered and washed with water (20

mL) to afford **27** as a white powder (220 mg, 46%).

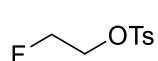
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.24 (dd, *J* = 4.8 Hz, 1.8 Hz, 1H, *H_{ar}*), 7.57 (dd, *J* = 7.6 Hz, 1.9 Hz, 1H, *H_{ar}*), 6.52 (dd, *J* = 7.5 Hz, 4.8 Hz, 1H, *H_{ar}*), 5.1 (br, 1H, *NH*), 3.00 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H, *CH*₃) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 159.0 (*C_{ar}*), 152.8 (*C_{ar}*), 141.2 (*C_{ar}*), 116.9 (*CN*), 111.7 (*C_{ar}*), 91.6 (*C_{ar}*), 28.3 (*CH*₃) ppm.

M.p.: 86-88°C

LC/MS: *t_R* = 3.37 min.; *m/z*: 134.39 [*M+H*]⁺.

2-fluoroethyl 4-méthylbenzenesulfonate (**28**)



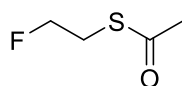
$C_9H_{11}FO_3S$
M.W.: 218.24 g/mol

To a solution of fluoroethanol (0.46 mL, 7.8 mmol, 1.0 eq) in DCM (30 mL) were added DMAP (100 mg, 0.8 mmol, 0.1 eq), TEA (2.1 mL, 15.6 mmol, 2.0 eq) and TsCl (2.23 g, 11.7 mmol, 1.5 eq). The mixture was stirred at room temperature under argon overnight. The mixture was quenched by water (20 mL) extracted with DCM (3 x 20 mL). The combined organic phases were washed with brine (20 mL), dried over sodium sulfate and concentrated under vacuum. The residue was purified by chromatography using Heptane/EtOAc 8/2 v/v to afford **28** as a colorless oil (1.68g, 99%).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.75 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, 2*H_{ar}*), 7.29 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, 2*H_{ar}*), 4.50 (td, *J_{H-F}* = 47.0 Hz, *J* = 4.0 Hz, 2H, *CH*₂), 4.20 (td, *J_{H-F}* = 27.2 Hz, *J* = 4.0 Hz, 2H, *CH*₂), 2.39 (s, 3H, *CH*₃) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 145.2 (*C_{ar}*), 132.6 (*C_{ar}*), 130.0 (2*C_{ar}*), 128.0 (2*C_{ar}*), 80.6 (d, *J_{C-F}* = 175.0 Hz, *CH*₂), 68.5 (d, *J_{C-F}* = 21.0 Hz, *CH*₂), 21.7 (*CH*₃) ppm.

Product not detected in LC-MS.

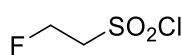
S-(2-fluoroethyl) ethanethioate (29)

C_4H_7FOS
M.W.: 122.16 g/mol

To a solution of **28** (0.80 g, 3.70 mmol, 1.0 eq) in acetone (10 mL) was added potassium thioacetate (500 mg, 4.40 mmol, 1.2 eq). The mixture was stirred at 70°C for 4h. The solution was filtered and the solid was further washed with acetone. The filtrate was concentrated under vacuum and the residue was partitioned between Et₂O (20 mL) and H₂O (20 mL). The organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated under vacuum to afford **29** (350 mg, 78%) as a brown oil. The crude was used in the next step without further purification.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 4.43 (td, $J_{H-F} = 47.5$ Hz, $J = 6.2$ Hz, 2H, CH₂), 3.13 (td, $J = 21.5$ Hz, 6.2 Hz, 2H, CH₂), 2.30 (s, 3H, CH₃) ppm.

Data were in accordance with literature.²¹¹

2-fluoroethane-1-sulfonyl chloride (30)

$C_2H_4ClFO_2S$
M.W.: 146.56 g/mol

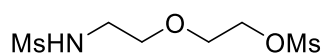
To a solution of **29** (300 mg, 2.5 mmol, 1.0 eq) in AcOH (4 mL) heated at 60°C was added a 30% v/v H₂O₂ solution in water (1.2 mL, 10.6 mmol, 4.3 eq). The mixture was heated for 3h at 60°C and, after cooling to room temperature, concentrated under vacuum. The residue was diluted in water (5 mL) and an aqueous solution of Na₂CO₃ (1 M, 1.2 mL) was added. The mixture was concentrated under vacuum and the residue was dissolved in DCM (6 mL). SOCl₂ (0.8 mL, 11.0 mmol, 5.5 eq) and 1 drop of DMF were added and the mixture was stirred for 5h under reflux. After cooling to room temperature, the mixture was filtered over oven-dried celite and eluted with DCM (5 mL). The mixture was then concentrated under vacuum to afford **30** as a colorless oil (153 mg, 43%)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 4.93 (td, $J_{H-F} = 47.1$ Hz, $J = 5.3$ Hz, 2H, CH₂), 4.00 (td, $J_{H-F} = 20.8$ Hz, $J = 5.4$ Hz, 2H, CH₂) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 75.6 (CH₂), 64.6 (d, $J_{C-F} = 23.0$ Hz, CH₂) ppm.

Product not detected in LC-MS.

2-(2-(méthylsulfonamido)ethoxy)ethyl methanesulfonate (**32**)



$C_6H_{15}NO_6S_2$
M.W.: 261.31 g/mol

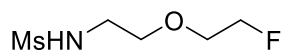
To a solution of 2-aminoethoxyethanol (1.0 g, 9.5 mmol, 1.0 eq) in DCM (10 mL) at 0°C were added TEA (3.3 mL, 25.0 mmol, 2.6 eq) and MsCl (2 mL, 25.0 mmol, 2.6 eq) dropwise. The mixture was stirred 12h at room temperature, and it was quenched with a saturated aqueous solution of NH_4Cl (10 mL). The phases were separated and the aqueous layer was extracted with DCM (3 x 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (10 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum to afford **32** (2.15 g, 83%) as a yellow oil.

1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 4.37 (td, $J = 4.3$ Hz, 2.5 Hz, 2H, CH_2), 3.75 (td, $J = 4.3$ Hz, 2.5 Hz, 2H, CH_2), 3.64 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, CH_2), 3.31 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, CH_2), 3.06 (s, 3H, CH_3), 2.97 (s, 3H, CH_3).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 70.1 (CH_2), 69.8 (CH_2), 68.8 (CH_2), 43.0 (CH_2), 40.28 (CH_3), 37.92 (CH_3).

LC/MS: $t_R = 3.23$ min.; m/z : 262.01 $[M+H]^+$.

N-(2-(2-fluoroethoxy)ethyl)methanesulfonamide (**33**)



$C_5H_{12}FNO_3S$
M.W.: 185.21 g/mol

To a solution of **32** (1.0 g, 3.83 mmol, 1.0 eq) in THF (8 mL) under argon was added a solution of TBAF (1 M in THF, 7.6 mL, 7.6 mmol, 2.0 eq). The mixture was stirred at room temperature for 2h and the mixture was concentrated and diluted with water (20 mL). The aqueous layer was extracted with DCM (3 x 20 mL) and the combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by chromatography using DCM/MeOH 95/5 v/v as eluent to afford **33** (760 mg, 90%)

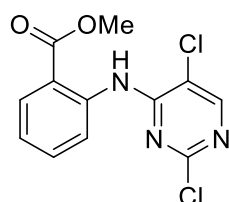
as a yellow oil.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 3.73-3.71 (m, 4H, 2CH₂), 3.16-3.14 (m, 4H, 2CH₂), 2.73 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 80.6 (d, *J*_{C-F} = 172.0 Hz, CH₂), 66.5 (2CH₂), 45.8 (CH₃), 40.0 (CH₂).

LC/MS: *t*_R = 3.55 min.; *m/z*: 186.13 [M+H]⁺.

Méthyl 2-((2,5-dichloropyrimidin-4-yl)amino)benzoate (35)



C₁₂H₉Cl₂N₃O₂
M.W.: 298.12 g/mol

To a solution of méthyl-2-aminobenzoate (1.00 g, 6.62 mmol, 1.1 eq) in *n*-BuOH (15 mL) was added trichloropyrimidine (1.10 g, 6.02 mmol, 1.0 eq) and anhydrous NaHCO₃ (607 mg, 7.22 mmol, 1.2 eq). The mixture was stirred at 80 °C for 16 h under argon. After being cooled to room temperature, the resulting precipitate was filtered, washed with water (40 mL) and dried under vacuum to afford **35** as a white powder (991 mg, 50 %).

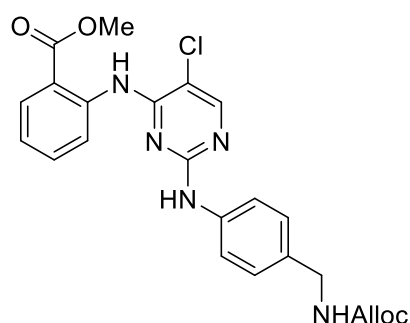
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.14 (s, 1H, NH), 8.54 (s, 1H, *H*_{ar}), 8.49 (dd, *J* = 8.4 Hz, 0.8 Hz, 1H, *H*_{ar}), 8.04 (dd, *J* = 8.0 Hz, 1.5 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.74 (ddd, *J* = 8.5 Hz, 7.4 Hz, 1.7 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.28 (ddd, *J* = 8.0 Hz, 7.4 Hz, 1.1 Hz, 1H, *H*_{ar}), 3.88 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 167.7 (C=O), 156.6 (*C*_{ar}), 156.4 (*C*_{ar}), 155.7 (*C*_{ar}), 139.3 (*C*_{ar}), 130.8 (*C*_{ar}), 123.7 (*C*_{ar}), 121.6 (*C*_{ar}), 117.8 (*C*_{ar}), 119.8 (*C*_{ar}), 114.9 (*C*_{ar}), 52.7 (CH₃) ppm.

M.p.: 230-232°C

LC/MS (ESI): *t*_R = 4.98 min; *m/z*: 298.04 [M+H]⁺.

Méthyl 2-((2-((4-(((allyloxy)carbonyl)amino)méthyl)phényl)amino)-5-chloropyrimidin-4-yl)amino)benzoate (36)



$C_{23}H_{22}ClN_5O_4$
M.W.: 467.91 g/mol

To a solution of **35** (991 mg, 3.34 mmol, 1.0 eq) and **22** (689 mg, 3.34 mmol, 1.0 eq) in *n*-BuOH (14 mL) was added HCl (4 M in dioxane, 0.92 mL, 3.67 mmol, 1.1 eq). The yellow mixture was stirred at 100 °C for 16 h under argon. After being cooled to room temperature, the solution was diluted with DCM (40 mL), washed with a 1 M aqueous solution of K_2CO_3 (50 mL) to adjust pH to 14 followed by brine (30 mL) and dried over $MgSO_4$. The organic phase was concentrated under reduced pressure. Dry *n*-pentane (30 mL) was added to the residue and the resulting precipitate was filtered, washed with *n*-pentane (50 mL) and dried under vacuum to afford **36** as a beige powder (1.05 g, 67 %).

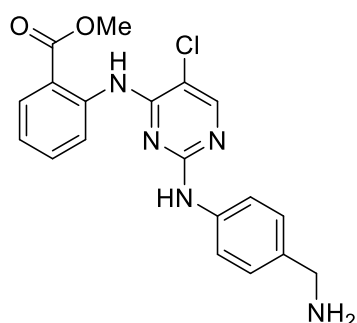
1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 11.00 (s, 1H, NH), 9.53 (s, 1H, NH), 8.92 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, NH), 8.28 (s, 1H, H_{ar}), 8.05 (dd, 1H, $J = 8.0$ Hz, 1.2 Hz, 1H, H_{ar}), 7.74 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H, H_{ar}), 7.59 (t, $J = 10.1$ Hz, 3H, H_{ar}), 7.17 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, H_{ar}), 5.92 (ddd, $J = 22.2$ Hz, 10.4 Hz, 5.2 Hz, 1H, CH), 5.38 – 5.10 (m, 2H, CH_2), 4.50 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H, CH_2), 4.15 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, CH_2), 3.90 (s, 3H, CH_3) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$): δ 202.3 (C), 168.0 (C), 157.7 ($2C_{ar}$), 156.2 (C_{ar}), 155.0 (C_{ar}), 141.1 (C_{ar}), 138.8 (C_{ar}), 133.8 (C_{ar}), 133.5 (CH), 130.9 (C_{ar}), 127.3 ($3C_{ar}$), 122.1 ($3C_{ar}$), 119.9 (C_{ar}), 116.9 (CH_2), 105.1 (C_{ar}), 64.3 (CH_2), 52.7 (CH_3), 43.4 (CH_2) ppm.

M.p.: 195-197°C

LC/MS: $t_R = 5.04$ min; m/z : 468.18 $[M+H]^+$.

Méthyl 2-((2-((4-(aminométhyl)phényl)amino)-5-chloropyrimidin-4-yl)amino)benzoate (37)



$C_{19}H_{18}ClN_5O_2$
M.W.: 383.84 g/mol

To a solution of **36** (885 mg, 1.89 mmol, 1.0 eq) in dry THF (25 mL) were added $Pd(PPh_3)_4$ (655 mg, 0.57 mmol, 0.3 eq) and diethylamine (1.9 mL, 18.90 mmol, 10.0 eq) under an argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. The volatiles were removed under vacuum. The residue was purified on silica gel chromatography (DCM/MeOH 98/2 to 94/6 v/v + 1 % NH_4OH) to afford **37** as a beige powder (498 mg, 70 %).

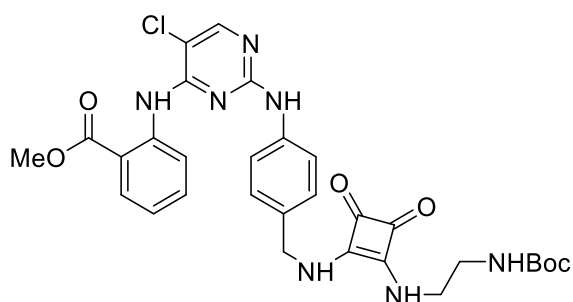
1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 10.99 (s, 1H, NH), 9.48 (s, 1H, NH), 8.93 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH), 8.27 (s, 1H, H_{ar}), 8.04 (dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz, 1H, H_{ar}), 7.66 – 7.60 (m, 2H, H_{ar}), 7.57 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H_{ar}), 7.24 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_{ar}), 7.21 – 7.15 (m, 1H, H_{ar}), 3.91 (s, 3H, CH_3), 3.67 (s, 2H, CH_2) ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$): δ 168.1 (C), 157.8 ($2C_{ar}$), 155.0 ($2C_{ar}$), 141.2 (C_{ar}), 138.3 (C_{ar}), 134.2 (C_{ar}), 130.9 (C_{ar}), 127.2 ($3C_{ar}$), 122.1 ($2C_{ar}$), 121.1 (C_{ar}), 119.8 (C_{ar}), 102.7 (C_{ar}), 52.7 (CH_3), 45.2 (CH_2) ppm.

M.p.: 163-166°C

LC/MS (ESI): $t_R = 3.63$ min; m/z : 384.06 $[M+H]^+$.

Méthyl 2-((2-((4-(((2-((tert-butoxycarbonyl)amino)éthyl)amino)-3,4-dioxocyclobut-1-en-1-yl)amino)méthyl)phényl)amino)-5-chloropyrimidin-4-yl)amino)benzoate (38)



$C_{30}H_{32}ClN_7O_6$
M.W.: 622.08 g/mol

To a solution of **37** (100 mg, 0.26 mmol, 1.0 eq) in anhydrous DMF (2 mL) were added **23** (70.2 mg, 0.26 mmol, 1.0 eq) and DIPEA (68 μ L, 0.39 mmol, 1.5 eq) under an argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at 100 °C for 16 h. The volatiles were removed under vacuum to afford **38** as a brown solid (88 mg, 55 %). The product was used without further purification.

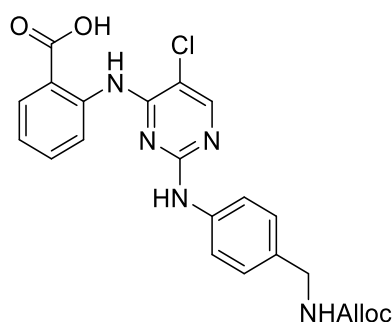
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.99 (s, 1H, NH), 9.58 (s, 1H, NH), 8.90 (bd, $J = 7.8$ Hz, 1H, NH), 8.28 (s, 1H, H_{ar}), 8.03 (dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, 1H, H_{ar}), 7.77 (bs, 1H, NH), 7.64 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H_{ar}), 7.59 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_{ar}), 7.40 (bs, 1H, NH), 7.26 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_{ar}), 7.16 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, H_{ar}), 6.91 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, H_{ar}), 4.66 (d, $J = 3.9$ Hz, 2H, CH₂), 3.90 (s, 3H, CH₃), 3.51 (s, 2H, CH₂), 3.09 (dd, $J = 11.4$ Hz, 5.7 Hz, 2H, CH₂), 1.35 (s, 9H, CH₃) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ 182.7 (2C), 168.1 (C), 157.7 (2C_{ar}), 155.8 (C), 155.0 (2C_{ar}), 141.1 (C_{ar}), 139.4 (C_{ar}), 134.1 (C_{ar}), 130.9 (C_{ar}), 127.9 (3C_{ar}), 122.1 (2C_{ar}), 121.2 (C_{ar}), 120.1 (C_{ar}), 115.6 (2C=C), 105.3 (C_{ar}), 77.8 (C_{tBu}), 52.7 (CH₃), 46.5 (CH₂), 43.3 (CH₂), 41.2 (CH₂), 28.2 (3CH₃) ppm.

M.p.: 238-239°C

LC/MS (ESI): $t_R = 4.53$ min; m/z : 622.32 [M+H]⁺.

2-((2-((4-(((allyloxy)carbonyl)amino)méthyl)phenyl)amino)-5-chloropyrimidin-4-yl)amino)benzoic acid (40)



C₂₂H₂₀ClN₅O₄
M.W.: 453.88 g/mol

To a solution of **36** (580 mg, 1.24 mmol, 1.0 eq) in water and dioxane (1/1 v/v, 25 mL) was added a 10 %wt NaOH aqueous solution (1.24 mL, 3.73 mmol, 3.0 eq). The reaction mixture was stirred at 50 °C for 16 h until the complete dissolution of **36**. The volatiles were removed under vacuum. The residue was taken up in water (100 mL) and washed with DCM (2 x 50

mL). Then, a solution of HCl (1 M, 5mL) was added to adjust pH to 1 and the resulting precipitate was filtered and washed with water (20 mL) to give **40** as a beige powder (394 mg, 70 %).

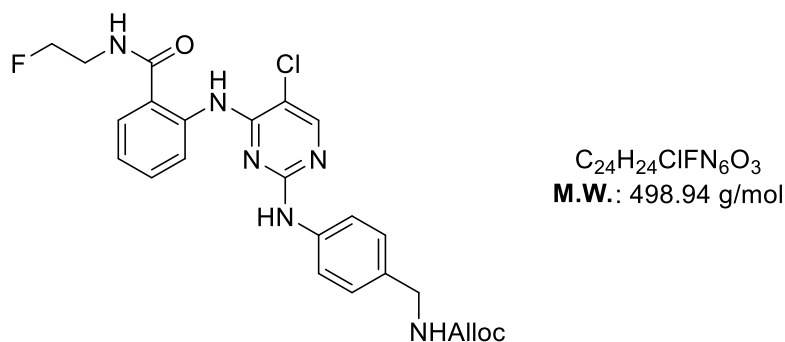
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.24 (bs, 1H, OH), 11.51 (s, 1H, NH), 9.51 (s, 1H, NH), 8.95 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, NH), 8.26 (s, 1H, *H*_{ar}), 8.04 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.81 – 7.50 (m, 4H, *H*_{ar}), 7.26 – 7.05 (m, 3H, *H*_{ar}), 5.92 (ddd, *J* = 15.4 Hz, 9.8 Hz, 4.9 Hz, 1H, CH), 5.23 (dd, *J* = 44.9 Hz, 13.6 Hz, 2H, CH₂), 4.50 (d, *J* = 4.6 Hz, 2H, CH₂), 4.15 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, CH₂) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ 169.9 (2C), 157.8 (C_{ar}), 156.2 (C_{ar}), 155.0 (C_{ar}), 154.8 (C_{ar}), 141.5 (C_{ar}), 138.8 (C_{ar}), 133.8 (C_{ar}), 133.7 (CH), 131.3 (C_{ar}), 127.3 (3C_{ar}), 121.8 (2C_{ar}), 120.7 (C_{ar}), 119.9 (C_{ar}), 116.9 (CH₂), 105.19 (C_{ar}), 64.3 (CH₂), 43.5 (CH₂) ppm.

LC/MS (ESI): t_R = 4.30 min; m/z: 454.46 [M+H]⁺.

M.p.: 255-259°C

allyl(4-((5-chloro-4-((2-((2-fluoroethyl)carbamoyl)phenyl)amino)pyrimidin-2-yl)amino)benzyl)carbamate (42)



To a solution of **36** (80 mg, 0.18 mmol, 1.0 eq) and 2-fluoroethanamine (36 mg, 0.36 mmol, 2.0 eq) in DMF were added HATU (103 mg, 0.27 mmol, 1.5 eq) and DIPEA (0.22 mL, 1.26 mmol, 7.0 eq). The resulting mixture was stirred at 40 °C for 20 h. The volatiles were removed under vacuum and the residue was taken up in DCM and water (1/1 v/v, 15 mL). The mixture was extracted with DCM (3 x 10 mL) and the combined organic phases were washed with a 1 M NaOH aqueous solution (20 mL), a 5 %wt LiCl aqueous solution (30 mL), brine (20 mL) and dried over Na₂SO₄. After filtration, the volatiles were removed under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on C18 silica (H₂O/ACN 9/1 to 1/9 v/v) to afford **42** as a beige powder (42 mg, 47 %).

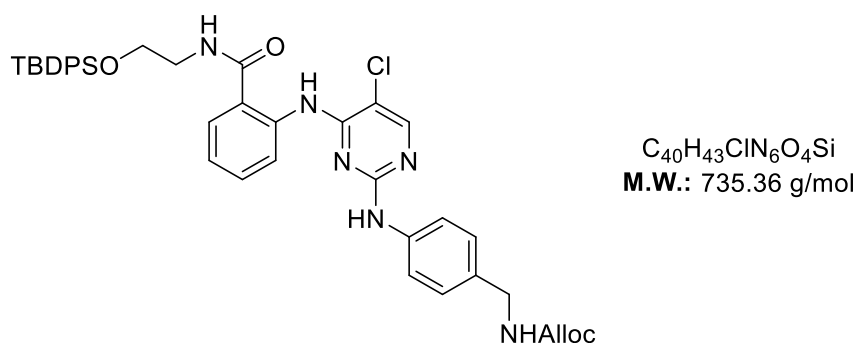
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.42 (s, 1H, NH), 9.45 (s, 1H, NH), 9.02 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, NH), 8.73 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, *H*_{ar}), 8.22 (s, 1H, *H*_{ar}), 7.80 (dd, *J* = 7.9 Hz, 1.4 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.72 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.59 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, *H*_{ar}), 7.50 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.20 – 7.11 (m, 3H, *H*_{ar}), 5.92 (ddd, *J* = 22.5 Hz, 10.6 Hz, 5.3 Hz, 1H, CH), 5.23 (ddd, *J* = 13.8 Hz, 11.7 Hz, 1.4 Hz, 2H, CH₂), 4.66 – 4.48 (m, 4H, 2CH₂), 4.14 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH₂), 3.60 (ddd, *J*_{H-F} = 26.7 Hz, *J* = 10.4 Hz, 5.2 Hz, 2H, CH₂)

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ 188.5 (C), 168.9 (C), 157.8 (C_{ar}), 156.2 (C_{ar}), 155.0 (C_{ar}), 154.7 (C_{ar}), 139.3 (C_{ar}), 139.0 (C_{ar}), 133.9 (C_{ar}), 133.1 (CH), 131.7 (C_{ar}), 127.3 (3C_{ar}), 122.0 (C_{ar}), 121.5 (C_{ar}), 120.6 (C_{ar}), 119.7 (C_{ar}), 117.0 (CH₂), 104.9 (C_{ar}), 81.92 (d, *J* = 165.9 Hz, CH₂), 64.3 (CH₂), 43.5 (CH₂), 37.0 (CH₂) ppm.

M.p.: 205-207°C

LC/MS (ESI): t_R = 4.32 min; m/z: 499.27 [M+H]⁺.

allyl(4-((4-((2-((2-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)ethyl)carbamoyl)phenyl)amino)-5-chloropyrimidin-2-yl)amino)benzyl)carbamate (43)



To a solution of **40** (400 mg, 0.88 mmol, 1.0 eq) and **41** (658 mg, 2.20 mmol, 2.5 eq) in DMF were added HATU (502 mg, 1.32 mmol, 1.5 eq) and DIPEA (1.08 mL, 6.16 mmol, 7.0 eq). The resulting mixture was stirred at 40 °C for 20 h. The volatiles were removed under vacuum and the residue was taken up in DCM and water (1/1 v/v, 100 mL). The mixture was extracted with DCM (3 x 50 mL) and the combined organic phases were washed with a 1 M NaOH aqueous solution (80 mL), a 5 % wt LiCl aqueous solution (80 mL), brine (80 mL) and dried over Na₂SO₄. After filtration, the volatiles were removed under vacuum. The residue was purified by silica gel chromatography using DCM/MeOH 99/1 v/v as eluent to afford **43** as a yellow sticky solid (530 mg, 81 %).

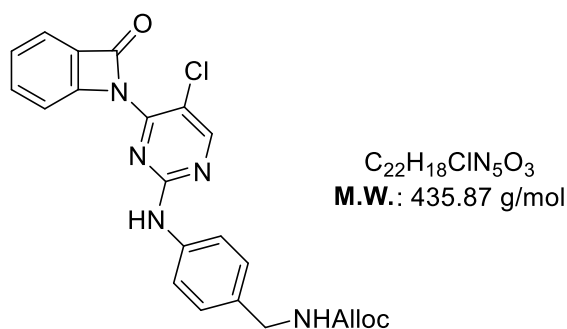
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.46 (s, 1H, NH), 9.47 (s, 1H, NH), 8.89 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, NH), 8.73 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, *H*_{ar}), 8.20 (s, 1H, *H*_{ar}), 7.58 (m, 2H, 2*H*_{ar}), 7.61, (m, 6H, 6*H*_{ar}), 7.50 – 7.33 (m, 8H, 8*H*_{ar}), 7.17 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, 2*H*_{ar}), 5.92 (ddd, *J* = 15.4 Hz, 9.8 Hz, 4.9 Hz, 1H, CH), 5.23 (dd, *J* = 44.9 Hz, 13.6 Hz, 2H, CH₂), 4.50 (d, *J* = 4.6 Hz, 2H, CH₂), 4.15 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, CH₂), 3.80 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, CH₂), 3.51 (q, *J* = 5.8 Hz, 2H, CH₂), 0.95 (s, 9H, 3CH₃) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ 169.0 (C), 161.3 (C), 156.1 (*C*_{ar}), 155.0 (*C*_{ar}), 154.5 (*C*_{ar}), 139.3 (*C*_{ar}), 139.0 (*C*_{ar}), 135.0 (6*C*_{ar}), 133.8 (*C*_{ar}), 133.0 (*C*_{ar}), 132.5 (*C*_{ar}), 131.4 (CH ou *C*_{ar}), 129.8 (CH ou *C*_{ar}), 128.0 (*C*_{ar}), 127.9 (5*C*_{ar}), 127.2 (2*C*_{ar}), 121.9 (*C*_{ar}), 121.5 (*C*_{ar}), 121.0 (*C*_{ar}), 119.5 (*C*_{ar}), 117.0 (CH₂), 105.1 (*C*_{ar}), 64.3 (CH₂), 62.0 (CH₂), 43.4 (CH₂), 41.5 (CH₂), 38.2 (C), 26.6 (3CH₃) ppm.

LC/MS (ESI): t_R = 6.02 min; m/z: 735.45 [M+H]⁺.

M.p.: 156-158 °C

allyl (4-((5-chloro-4-(8-oxo-7-azabicyclo[4.2.0]octa-1(6),2,4-trien-7-yl)pyrimidin-2-yl)amino)benzyl)carbamate (44)



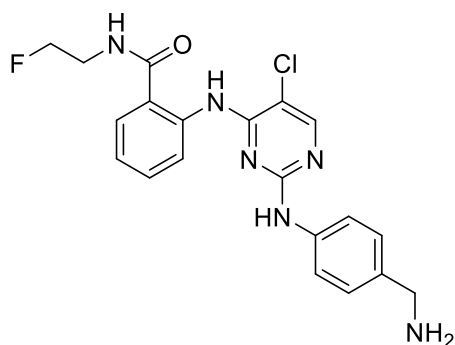
This compound was obtained as a by-product during the synthesis of compound **42** previously described.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.52 (s, 1H, NH), 8.26 (dd, *J* = 8.1 Hz, 1.2 Hz, 1H, NH), 7.94 (ddd, *J* = 8.5 Hz, 7.1 Hz, 1.5 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.91 (s, 1H, *H*_{ar}), 7.79 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.71 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.64 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 2*H*_{ar}), 7.55 (ddd, *J* = 8.1 Hz, 7.2 Hz, 1.1 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.29 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2*H*_{ar}), 5.93 (ddd, *J* = 22.6 Hz, 10.6 Hz, 5.4 Hz, 1H, CH), 5.24 (ddd, *J* = 13.9 Hz, 11.8 Hz, 1.5 Hz, 2H, CH₂), 4.50 (dt, *J* = 5.3 Hz, 1.5 Hz, 2H, CH₂), 4.19 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H, CH₂) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ 164.2 (C), 156.2 (C), 148.1 (*C*_{ar}), 146.7 (*C*_{ar}), 144.9 (*C*_{ar}), 136.3 (*C*_{ar}), 136.0 (*C*_{ar}), 133.8 (2*C*_{ar}), 127.8 (*C*_{ar}), 127.3 (*C*_{ar}), 126.6 (*C*_{ar}), 126.3 (*C*_{ar}), 122.2 (3*C*_{ar}), 118.7 (*C*_{ar}), 117.0 (CH₂), 112.7 (CH), 105.5 (*C*_{ar}), 64.4 (CH₂), 43.4 (CH₂) ppm.

LC/MS (ESI): $t_R = 4.94$ min; m/z : 436.46 $[M+H]^+$.

2-((5-chloro-2-((4-(hydroxyméthyl)phényl)amino)pyrimidin-4-yl)amino)-*N*-(2-fluoroéthyl)benzamide (45)



$C_{20}H_{19}ClFN_5O_2$
M.W.: 415.85 g/mol

To a solution of **42** (110 mg, 0.22 mmol, 1.0 eq) in anhydrous THF (4 mL) were added $Pd(PPh_3)_4$ (51 mg, 0.044 mmol, 0.2 eq) and diethylamine (160 μ L, 1.54 mmol, 7.0 eq) under an argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h. The volatiles were removed under vacuum. The residue was purified by silica gel chromatography (DCM/MeOH 98/2 to 97/3 v/v + 1 % NH_4OH) to afford **45** as a beige powder (6.5 mg, 39 %).

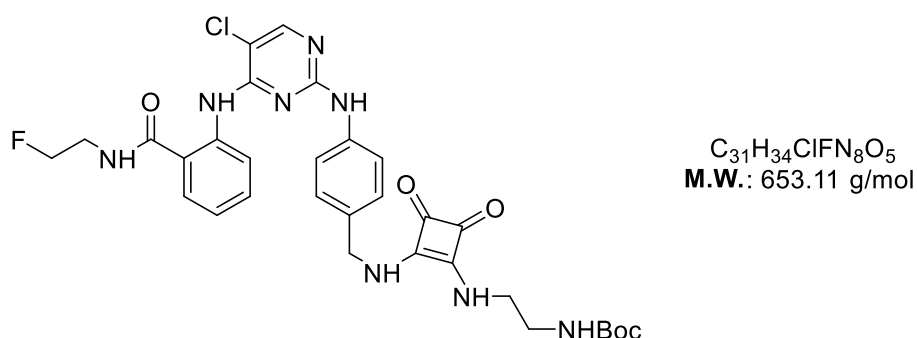
1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 11.42 (s, 1H, NH), 9.42 (s, 1H, NH), 9.04 (bs, 2H, NH_2), 8.76 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H_{ar}), 8.22 (s, 1H, H_{ar}), 7.81 (dd, $J = 7.9, 1.3$ Hz, 1H, H_{ar}), 7.60 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_{ar}), 7.56 – 7.50 (m, 1H, H_{ar}), 7.23 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H_{ar}), 7.20 – 7.14 (m, 1H, H_{ar}), 4.57 (dt, $J_{H-F} = 47.4, J = 5.1$ Hz, 2H, CH_2), 3.68 (s, 2H, CH_2), 3.61 (dd, $J_{H-F} = 26.8, J = 4.1$ Hz, 2H, CH_2) ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$): δ 168.9 (C), 157.8 (C_{ar}), 155.0 (C_{ar}), 154.7 ($2C_{ar}$), 139.4 (C_{ar}), 138.5 (C_{ar}), 131.7 (C_{ar}), 128.8 (C_{ar}), 128.2 (C_{ar}), 127.2 ($2C_{ar}$), 122.0 ($2C_{ar}$), 121.5 (C_{ar}), 120.6 (C_{ar}), 104.9 (C_{ar}) 81.9 (d, $J_{C-F} = 165.8$ Hz, CH_2), 45.1 (CH_2), 36.4 (CH_2) ppm.

M.p.: 256°C

LC/MS (ESI): $t_R = 3.42$ min; m/z : 416.17 $[M+H]^+$.

tert-butyl (2-((2-((4-((5-chloro-4-((2-((2-fluoroethyl)carbamoyl)phenyl)amino)pyrimidin-2-yl)amino)benzyl)amino)-3,4-dioxocyclobut-1-en-1-yl)amino)ethyl)carbamate (46)



To a solution of **45** (52 mg, 0.13 mmol, 1.0 eq) in anhydrous DMF (1 mL) were added **BF** (34 mg, 0.13 mmol, 1.0 eq) and DIPEA (33 μ L, 0.19 mmol, 1.5 eq) under argon atmosphere at room temperature. The reaction mixture was stirred at 100 °C for 16 h hours. The volatiles were removed under vacuum. The residue was purified by silica gel column chromatography using DCM/MeOH 97/3 to 94/6 v/v + 1% NH₄OH as eluent to afford the desired compound **46** as a beige solid (48 mg, 59%).

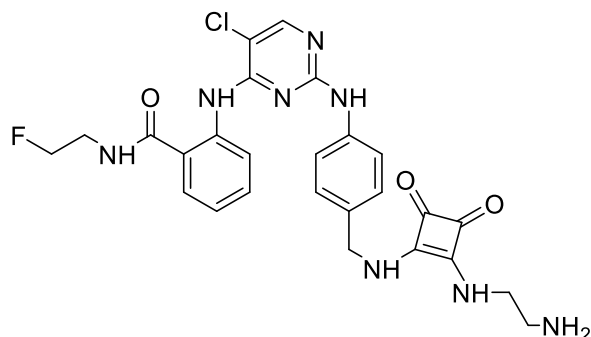
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.44 (s, 1H, NH), 9.52 (s, 1H, NH), 9.04 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, *H*_{ar}), 8.76 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, NH), 8.22 (s, 1H, *H*_{ar}), 7.81 (dd, *J* = 7.9, 1.3 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.65 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2*H*_{ar}), 7.49 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, *H*_{ar}), 7.23 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 2*H*_{ar}), 7.15 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, *H*_{ar}), 6.91 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, NH), 4.65 (s, 2H, CH₂), 4.57 (dt, *J*_{H-F} = 47.4, *J* = 5.1 Hz, 2H, CH₂), 3.61 (dd, *J*_{H-F} = 26.8, *J* = 4.1 Hz, 2H, CH₂), 3.57 (m, 2H, CH₂), 3.09 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH₂), 1.35 (s, 9H, 3CH₃) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ 182.7 (2C), 168.9 (C), 157.8 (C_{ar} + C), 155.0 (C_{ar}), 154.7 (2C_{ar}), 139.4 (C_{ar}), 138.5 (C_{ar}), 131.7 (C_{ar}), 128.8 (C_{ar}), 128.2 (2C_{ar}), 127.2 (2C_{ar}), 122.0 (2C_{ar}), 121.5 (C_{ar}), 120.6 (2C_{ar}), 104.9 (C_{ar}) 81.9 (d, *J*_{C-F} = 165.8 Hz, CH₂), 81.1 (C), 46.5 (CH₂), 43.2 (CH₂), 41.4 (CH₂), 40.8 (CH₂), 28.1 (3CH₃) ppm.

LC/MS (ESI): *t*_R = 3.99 min; *m/z*: 653.33 [M+H]⁺.

M.p.: 222-225°C

2-((2-((4-(((2-((2-aminoethyl)amino)-3,4-dioxocyclobut-1-en-1-yl)amino)méthyl)phenyl)amino)-5-chloropyrimidin-4-yl)amino)-N-(2-fluoroethyl)benzamide (47)



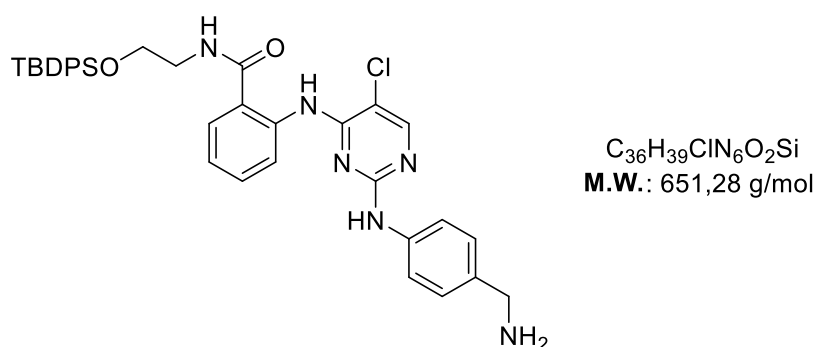
$C_{26}H_{26}ClFN_8O_3$
M.W.: 553.00 g/mol

Compound **46** (30 mg, 0.045 mmol, 1 eq) was added to a mixture DCM/TFA (2/1 v/v, 600 μ L) at room temperature. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. The volatiles were removed under vacuum to afford the desired compound as a brown gum (35 mg, quant.).

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 11.44 (s, 1H, NH), 9.52 (s, 1H, NH), 9.04 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, H_{ar}), 8.76 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, NH), 8.22 (s, 1H, H_{ar}), 7.81 (dd, $J = 7.9, 1.3$ Hz, 1H, H_{ar}), 7.65 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, $2H_{ar}$), 7.49 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H_{ar}), 7.23 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, $2H_{ar}$), 7.15 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, H_{ar}), 6.91 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H, NH), 4.65 (s, 2H, CH_2), 4.57 (dt, $J_{H-F} = 47.4, J = 5.1$ Hz, 2H, CH_2), 3.61 (dd, $J_{H-F} = 26.8, J = 4.1$ Hz, 2H, CH_2), 3.57 (m, 2H, CH_2), 3.09 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, CH_2) ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ 182.4 (2C), 168.9 (C), 157.6 ($C_{ar} + C$), 155.0 (C_{ar}), 154.7 ($2C_{ar}$), 139.4 (C_{ar}), 138.5 (C_{ar}), 130.7 (C_{ar}), 128.8 (C_{ar}), 128.2 ($2C_{ar}$), 127.2 ($2C_{ar}$), 122.0 ($2C_{ar}$), 121.2 (C_{ar}), 120.6 ($2C_{ar}$), 104.9 (C_{ar}) 81.9 (d, $J_{C-F} = 165.8$ Hz, CH_2), 46.5 (CH_2), 43.2 (CH_2), 41.3 (CH_2), 40.8 (CH_2) ppm.

LC/MS (ESI): $t_R = 3.39$ min; m/z : 553.17 [$M+H$] $^+$.

2-((2-((4-(aminométhyl)phényl)amino)-5-chloropyrimidin-4-yl)amino)-N-(2-((tert-butyl)di-phénylsilyl)oxy)éthyl)benzamide (48)

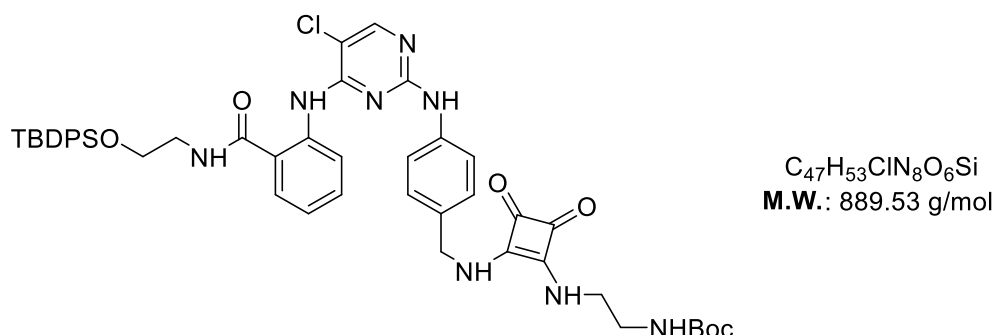
To a solution of **43** (440 mg, 0.60 mmol, 1.0 eq) in anhydrous THF (12 mL) were added $Pd(PPh_3)_4$ (208 mg, 0.18 mmol, 0.2 eq) and diethylamine (440 μ L, 4.19 mmol, 7.0 eq) under an argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h. The volatiles were removed under vacuum. The residue was purified by silica gel chromatography (DCM/MeOH 98/2 to 95/5 v/v + 1 % NH_4OH) to afford **48** as a yellow gum (200 mg, 51 %).

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 11.46 (s, 1H, NH), 9.43 (s, 1H, NH), 8.89 (s, 1H, NH), 8.73 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H_{ar}), 8.20 (s, 1H, H_{ar}), 7.80 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_{ar}), 7.61, (m, 6H, $6H_{ar}$), 7.53 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, H_{ar}), 7.45-7.35 (m, 6H, $6H_{ar}$), 7.21 (m, 3H, $3H_{ar}$), 3.81 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, CH_2), 3.69 (s, 2H, CH_2), 3.51 (q, $J = 5.8$ Hz, 2H, CH_2), 0.97 (s, 9H, $3CH_3$) ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ 168.7 (C), 157.7 (C_{ar}), 155.0 (C_{ar}), 154.5 (C_{ar}), 139.3 (C_{ar}), 138.5 (C_{ar}), 135.0 ($6C_{ar}$), 133.0 (C_{ar}), 131.5 (C_{ar}), 129.8 ($2C_{ar}$), 128.8 (C_{ar}), 127.8 ($5C_{ar}$), 127.2 ($2C_{ar}$), 121.9 (C_{ar}), 121.5 (C_{ar}), 121.0 (C_{ar}), 119.4 (C_{ar}), 105.0 (C_{ar}), 62.0 (CH_2), 45.2 (CH_2), 41.5 (CH_2), 26.6 ($3CH_3$), 18.7 (C) ppm.

LC/MS (ESI): $t_R = 4.59$ min; m/z : 651.29 $[M+H]^+$.

tert-butyl(2-((2-((4-((2-((2-((tert-butylidiphenylsilyl)oxy)ethyl)carbamoyl)phenyl)amino)-5-chloropyrimidin-2-yl)amino)benzyl)amino)-3,4-dioxocyclobut-1-en-1-yl)amino)ethyl)carbamate (49)



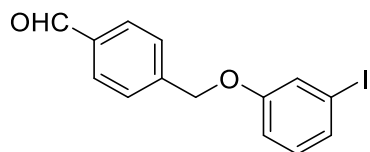
To a solution of **48** (180 mg, 0.28 mmol, 1.0 eq) in anhydrous DMF (4 mL) were added **23** (76 mg, 0.28 mmol, 1.0 eq) and DIPEA (75 μ L, 0.42 mmol, 1.5 eq) under argon atmosphere at room temperature. The reaction mixture was stirred at 100 °C for 16 h. The volatiles were removed under vacuum. The residue was purified by silica gel column chromatography using DCM/MeOH 97/3 to 94/6 v/v + 1% NH_4OH as eluent to afford the desired compound **49** as a yellow sticky solid (130 mg, 52%).

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 11.46 (s, 1H, NH), 9.53 (s, 1H, NH), 8.89 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H, NH), 8.73 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H_{ar}), 8.22 (s, 1H, H_{ar}), 7.80 (dd, $J = 8.0, 1.3$ Hz, 1H, H_{ar}), 7.61 (m, 6H, $6H_{ar}$), 7.49 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, H_{ar}), 7.45-7.35 (m, 6H, $6H_{ar}$), 7.26 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, $2H_{ar}$), 7.17 (m, 1H, H_{ar}), 6.92 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, NH), 4.67 (s, 2H, CH_2), 3.81 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, CH_2), 3.51 (q, $J = 5.8$ Hz, 2H, CH_2), 3.18 (m, 2H, CH_2), 3.11 (m, 2H, CH_2), 1.35 (s, 9H, $3CH_3$), 0.97 (s, 9H, $3CH_3$) ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ 182.7 (2C), 168.7 (C), 162.3 (C_{ar}), 157.7 (C_{ar}), 155.0 ($2C_{ar}$), 139.5 (C_{ar}), 139.2 (C_{ar}), 135.0 ($6C_{ar}$), 133.0 ($3C_{ar}$), 131.4 ($2C_{ar}$), 129.8 ($3C_{ar}$), 127.8 ($8C_{ar}$), 121.9 (C_{ar}), 121.5 (C_{ar}), 121.0 (C_{ar}), 119.8 (C_{ar}), 105.0 (C_{ar}), 80.1 (C), 62.0 (CH_2), 46.5 (CH_2), 43.2 (CH_2), 41.5 (CH_2), 41.1 (CH_2), 28.2 ($3CH_3$), 26.5 ($3CH_3$), 18.7 (C) ppm.

LC/MS (ESI): $t_R = 3.78$ min; m/z : 889,52 $[M+H]^+$.

M.p.: 170-175°C

4-((3-iodophenoxy)méthyl)benzaldehyde (50)

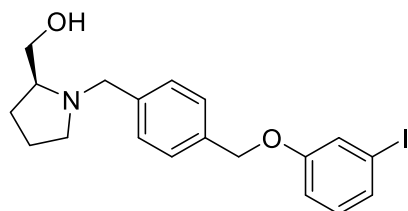
$C_{14}H_{11}IO_2$
M.W.: 338.15 g/mol

To a solution of 3-iodophenol (1.30 g, 5.93 mmol, 1.0 eq) in DMF (50 mL) were added potassium carbonate (2.07 g, 15.0 mmol, 2.5 eq) and 4-bromométhylbenzaldehyde (1.50 g, 7.54 mmol, 1.5 eq). The mixture was stirred at 80°C for 5h. After cooling to room temperature, the mixture was quenched with water (80 mL), and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with an aqueous solution of LiCl (5% w/v, 20 mL) and with brine (20 mL). The organic phase was dried over sodium sulfate, filtered and concentrated. The residue was purified by chromatography using heptane/ethyl acetate (95/5 v/v) as eluent to afford the **50** as a colorless oil (1.70g, 86%).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 10.03 (s, 1H, CHO), 7.91 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, 2*H_{ar}*), 7.58 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, 2*H_{ar}*), 7.32 (m, 2H, 2*H_{ar}*), 7.01 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, *H_{ar}*), 6.93 (ddd, *J* = 8.4 Hz, 2.5 Hz, 1.0 Hz, 1H, *H_{ar}*), 5.12 (s, 2H, CH₂).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 191.8 (CHO), 158.9 (*C_{ar}*), 143.3 (*C_{ar}*), 136.1 (*C_{ar}*), 130.9 (*C_{ar}*), 130.6 (*C_{ar}*), 130.1 (2*C_{ar}*), 127.5 (2*C_{ar}*), 124.1 (*C_{ar}*), 114.4 (*C_{ar}*), 94.3 (*C_{ar}*), 69.3 (CH₂).

LC/MS: *t_R* = 5.23 min.; *m/z*: 337.08 [M-H]⁻.

(S)-(1-(4-((3-iodophenoxy)méthyl)benzyl)pyrrolidin-2-yl)methanol (51)

$C_{19}H_{22}INO_2$
M.W.: 423.30 g/mol

To a solution of **50** (1.70g, 5.06 mmol, 1.0 eq) in dry DCM (60 mL) were added (*S*)-pyrrolidinemethanol (613 mg, 6.07 mmol, 1.2 eq) and sodium triacetoxyborohydride (1.60 g, 7.60 mmol, 1.5 eq). The mixture was stirred at room temperature for 15h under argon. The mixture was then quenched with water (30 mL), the phases were separated and the aqueous

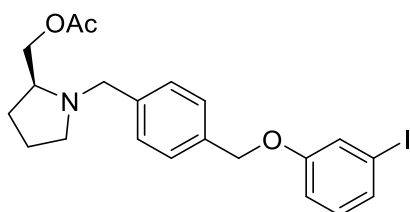
layer was extracted with DCM (3 x 30 mL). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by chromatography using DCM/MeOH 95/5 v/v as eluent to afford the desired compound **51** as a yellow oil (1.70 g, 81%).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.57 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, 2*H_{ar}*), 7.45 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, 2*H_{ar}*), 7.32 (m, 2H, 2*H_{ar}*), 7.01 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, *H_{ar}*), 6.93 (ddd, *J* = 8.4 Hz, 2.5 Hz, 1.0 Hz, 1H, *H_{ar}*), 5.44 (br, 1H, OH), 5.03 (s, 2H, CH₂), 4.33 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H, CH₂), 3.98 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H, CH₂), 3.80 (m, 2H, CH₂), 3.38 (m, 2H, CH₂), 2.78 (m, 1H, CH), 2.05-1.88 (m, 4H, 2CH₂).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 159.1 (*C_{ar}*), 137.7 (*C_{ar}*), 130.9 (3*C_{ar}*), 130.3 (2*C_{ar}*), 128.0 (2*C_{ar}*), 124.1 (*C_{ar}*), 114.5 (*C_{ar}*), 94.4 (*C_{ar}*), 69.5 (CH₂), 67.8 (CH), 61.2 (CH₂), 58.9 (CH₂), 53.9 (CH₂), 26.7 (CH₂), 23.5 (CH₂).

LC/MS: t_R = 3.72 min.; m/z: 424.40 [M+H]⁺.

(S)-(1-(4-((3-iodophenoxy)méthyl)benzyl)pyrrolidin-2-yl)méthyl acetate (52)



C₂₁H₂₄INO₃
M.W.: 465.33 g/mol

To a solution of **51** (500 mg, 1.18 mmol, 1.0 eq) in dry DCM (25 mL) were added pyridine (285 μL, 3.6 mmol, 3.0 eq) and acetic anhydride (250 μL, 2.40 mmol, 2.0 eq) at 0°C under argon. The mixture was allowed to reach room temperature and was stirred for 6h. The mixture was slowly quenched with a saturated aqueous solution of ammonium chloride (10 mL). The phases were separated and the aqueous layer was extracted with DCM (2 x 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by chromatography using heptane/ethyl acetate 7/3 v/v as eluent to afford **52** as a colorless oil (400 mg, 73%).

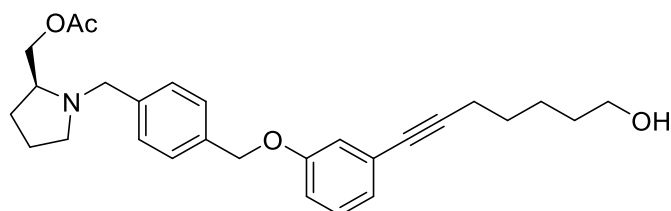
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.33-7.31 (m, 4H, 4*H_{ar}*), 7.28 (td, *J* = 7.8 Hz, 1.1 Hz, 1H, *H_{ar}*), 7.25 (s, 1H, *H_{ar}*), 6.98 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, *H_{ar}*), 6.91 (ddd, *J* = 8.4 Hz, 2.5 Hz, 1.0 Hz, 1H, *H_{ar}*),

4.99 (s, 2H, CH_2), 4.06 (m, 3H, $CH_2 + CH$), 3.40 (d, $J = 13.4$ Hz, 1H, CH_2), 2.95-2.77 (m, 2H, CH_2), 2.23 (qd, $J = 7.8$ Hz, 1.5 Hz, 1H, CH), 2.04 (s, 3H, CH_3), 1.99-1.60 (m, 4H, $2CH_2$) ppm.

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 171.13 (C_{ar}), 159.4 (C_{ar}), 139.6 (C_{ar}), 135.0 (C_{ar}), 130.8 (C_{ar}), 130.1 (CH_{ar}), 129.1 ($2CH_{ar}$), 127.5 ($2CH_{ar}$), 124.1 (CH_{ar}), 114.5 (CH_{ar}), 94.4 (C_{ar}), 70.0 (CH_2), 67.1 (CH_2), 61.9 (CH), 59.1 (CH_2), 54.5 (CH_2), 28.4 (CH_2), 23.0 (CH_2), 21.1 (CH_3) ppm.

LC/MS: $t_R = 3.89$ min.; m/z : 466.14 $[M+H]^+$.

(S)-1-(4-((3-(7-hydroxyhept-1-yn-1-yl)phenoxy)méthyl)benzyl)pyrrolidin-2-yl)méthyl acetate (53)



$C_{28}H_{35}NO_4$
M.W.: 449.59 g/mol

To a degassed solution of **52** (200 mg, 0.43 mmol, 1.0 eq) in DMF (6 mL) were added bistriphenylphosphine palladium dichloride (14 mg, 0.02 mmol, 0.05 eq), CuI (8 mg, 0.04 mmol, 0.1 eq), TEA (0.2 mL, 1.30 mmol, 3.0 eq) and hept-6-yn-1-ol (100 mg, 0.90 mmol, 2.0 eq). The reaction mixture was stirred 2h at 70°C. After cooling to room temperature, the mixture was diluted with water (10 mL) and ethyl acetate (10 mL). The phases were separated and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (2 x 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (10 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by chromatography using ethyl acetate/heptane 6/4 v/v as eluent to afford the **53** as a yellow oil (170 mg, 88%)

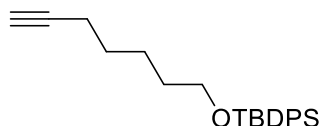
1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.37-7.32 (m, 4H, $4H_{ar}$), 7.18 (td, $J = 7.8$ Hz, 1.1 Hz, 1H, H_{ar}), 7.01-6.98 (m, 2H, $2H_{ar}$), 6.91 (ddd, $J = 8.4$ Hz, 2.5 Hz, 1.0 Hz, 1H, H_{ar}), 5.02 (s, 2H, CH_2), 4.06 (m, 3H, $CH_2 + CH$), 3.69-3.63 (m, 4H, $2CH_2$), 3.41 (d, $J = 13.4$ Hz, 1H, CH_2), 2.95-2.90 (m, 1H, CH_2), 2.85-2.78 (m, 1H, CH_2), 2.42 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_2), 2.30-2.20 (m, 3H, $CH + CH_2$), 2.05 (s, 3H, CH_3), 1.76-1.42 (m, 6H, $3CH_2$).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 171.2 (C), 159.3 (C_{ar}), 137.7 (C_{ar}), 134.9 (C_{ar}), 129.8 ($3C_{ar}$), 126.5 ($2C_{ar}$), 127.4 (C_{ar}), 118.2 (C_{ar}), 114.2 ($2C_{ar}$), 105.4 (C), 88.9 (C), 69.8 (CH_2), 67.2 (CH_2),

63.0 (CH₂), 61.8 (CH), 59.2 (CH₂), 53.4 (CH₂), 36.0 (CH₂), 29.3 (2CH₂), 28.4 (CH₂), 24.7 (CH₂), 22.4 (CH₂), 20.5 (CH₃) ppm.

LC/MS: $t_R = 3.73$ min.; $m/z: 450.35$ [M+H]⁺.

tert-butyl(hept-6-yn-1-yloxy)diphenylsilane (54)



C₂₃H₃₀OSi
M.W.: 350.58 g/mol

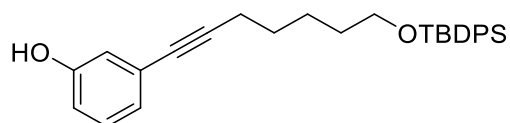
To a solution of TBDPSCl (654 μL, 2.5 mmol, 1.2 eq) and imidazole (170 mg, 2.5 mmol, 1.2 eq) in DMF (2 mL) under argon was added a solution of hept-6-yn-1-ol (240 mg, 2.1 mmol, 1.0 eq) in DMF (1 mL). The mixture was stirred for 15h under argon at room temperature and concentrated under vacuum. The residue was partitioned between water (20 mL) and EtOAc (20 mL). The phases were separated, and the aqueous layer was extracted with EtOAc (2 x 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by chromatography (Heptane/EtOAc 98/2 v/v) to afford **54** (470 mg, 63%) as a colorless oil.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.69 (dd, $J = 7.6$ Hz, 1.6 Hz, 4H, 4*H*_{ar}), 7.41 (m, 6H, 6*H*_{ar}), 3.68 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H, CH₂), 2.18 (m, 2H, CH₂), 1.94 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H, CH), 1.56 (m, 6H, 3CH₂), 1.06 (s, 9H, 3CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 135.6 (4*C*_{ar}), 134.1 (2*C*_{ar}), 129.6 (2*C*_{ar}), 127.6 (4*C*_{ar}), 84.6 (C), 68.2 (C), 63.7 (CH), 32.0 (CH₂), 28.2 (CH₂), 26.9 (3CH₃), 25.0 (CH₂), 19.2 (CH₂), 18.4 (CH₂).

LC/MS: $t_R = 3.23$ min.; $m/z: 262.01$ [M+H]⁺.

3-(7-((tert-butyl)diphenylsilyl)oxy)hept-1-yn-1-yl)phenol (55)



C₂₉H₃₄O₂Si
M.W.: 442.67 g/mol

To a degassed solution of **54** (2.40g, 6.86 mmol, 2.0 eq), bistriphenylphosphine palladium

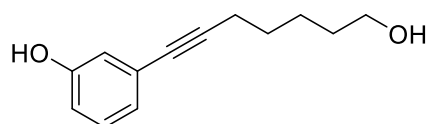
dichloride (245 mg, 0.35 mmol, 0.1 eq), CuI (67 mg, 0.35 mmol, 0.1 eq) and TEA (10 mL) in DMF (25 mL) was added 3-iodophenol (770 mg, 3.50 mmol, 1.0 eq). The mixture was stirred 2h at 60°C under argon. After cooling to room temperature, the mixture was concentrated under vacuum. The residue was partitioned between EtOAc (20 mL) and a saturated aqueous solution of ammonium chloride (20 mL). The phases were separated and the aqueous phase was extracted with EtOAc (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by chromatography using Heptane/EtOAc 9/1 v/v as eluent to give **55** as a brown oil (1.00g, 65%).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.68 (dd, *J* = 7.6 Hz, 1.2 Hz, 4H, 4*H_{ar}*), 7.45-7.35 (m, 6H, 6*H_{ar}*), 7.17-7.01 (m, 4H, 4*H_{ar}*), 4.96 (bs, 1H, OH), 3.69 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂), 2.38 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂), 1.57 (m, 6H, 3CH₂), 1.06 (s, 9H, 3CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 155.2 (C_{ar}), 135.6 (4C_{ar}), 134.1 (C_{ar}), 130.8 (C_{ar}), 129.5 (3C_{ar}), 127.6 (4C_{ar}), 124.3 (C_{ar}), 118.8 (C_{ar}), 118.3 (C_{ar}), 115.0 (C_{ar}), 114.3 (C), 90.4 (C), 80.3 (CH₂), 63.8 (CH₂), 32.1 (CH), 28.4 (CH₂), 26.9 (3CH₃), 25.2 (CH₂), 19.4 (CH₂).

LC/MS: t_R = 6.71 min.; m/z: 441.39 [M-H]⁻.

3-(7-hydroxyhept-1-yn-1-yl)phenol (**56**)



C₁₃H₁₆O₂
M.W.: 204.27 g/mol

To a degassed solution of hept-6-yn-1-ol (3.00g, 27.2 mmol, 2.0 eq), bistrisphenylphosphine palladium dichloride (300 mg, 0.43 mmol, 0.03 eq), CuI (266 mg, 0.14 mmol, 0.1 eq) and TEA (10 mL) in DMF (60 mL) was added 3-iodophenol (3.00 g, 13.50 mmol, 1.0 eq). The mixture was stirred 2h at 70°C under argon. After cooling to room temperature, the mixture was concentrated under vacuum. The residue was partitioned between EtOAc (30 mL) and a saturated aqueous solution of ammonium chloride (30 mL). The phases were separated and the aqueous phase was extracted with EtOAc (3 x 30 mL). The combined organic layers were washed with brine (30 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by chromatography using Heptane/EtOAc 6/4 v/v as eluent to give **56**

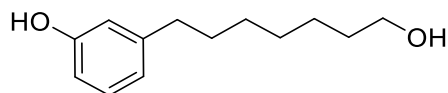
as a brown oil (2.50 g, 90%).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.13 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, *H*_{ar}), 6.95 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, *H*_{ar}), 6.86 (dd, *J* = 2.4 Hz, 1.5 Hz, 1H, *H*_{ar}), 6.76 (ddd, *J* = 7.8 Hz, 2.4 Hz, 1.7 Hz, 1H, *H*_{ar}), 5.90 (br, 1H, OH), 3.70 (t, *J* = 6.30 Hz, 2H, CH₂), 2.41 (t, *J* = 6.70 Hz, 2H, CH₂), 1.58 (m, 6H, 3CH₂).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 155.5 (*C*_{ar}), 129.5 (*C*_{ar}), 125.1 (*C*_{ar}), 124.0 (*C*_{ar}), 118.3 (*C*_{ar}), 115.1 (*C*_{ar}), 90.1 (C), 80.6 (C), 63.0 (CH₂) 32.1 (CH₂), 28.3 (CH₂), 25.0 (CH₂), 19.3 (CH₂).

LC/MS: *t*_R = 3.97 min.; *m/z*: 205.15 [M+H]⁺.

3-(7-hydroxyheptyl)phenol (57)



$C_{13}H_{20}O_2$
M.W.: 208.30 g/mol

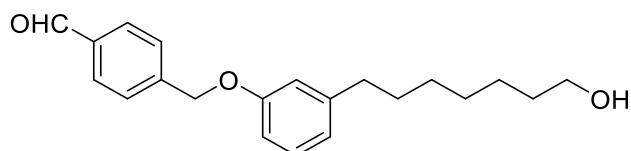
To a solution of **56** (680 mg, 3.33 mmol, 1.0 eq) in MeOH (5 mL) was added 10% Pd/C (70 mg, 0.06 mmol, 0.01 eq) and the solution was stirred 3h under H₂ (1 atm) at room temperature. The mixture was filtrated over celite and the filtrate was concentrated under vacuum to afford **57** as a brown oil (590 mg, 84 %).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.13 (t, *J* = 7.60 Hz, 1H, *H*_{ar}), 6.75 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, *H*_{ar}), 6.64 (m, 2H, 2*H*_{ar}), 4.97 (br, 1H, OH), 3.65 (t, *J* = 6.70 Hz, 2H, CH₂), 2.56 (t, *J* = 7.70 Hz, 2H, CH₂), 1.58 (m, 4H, 2CH₂), 1.34 (m, 6H, 3CH₂).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 155.5 (*C*_{ar}), 144.8 (*C*_{ar}), 129.4 (*C*_{ar}), 120.9 (*C*_{ar}), 115.3 (*C*_{ar}), 112.5 (*C*_{ar}), 63.1 (CH₂), 35.7 (CH₂), 32.7 (CH₂) 31.1 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.1 (CH₂), 25.6 (CH₂).

LC/MS: *t*_R = 4.10 min.; *m/z*: 207.13 [M-H]⁻.

4-((3-(7-hydroxyheptyl)phenoxy)méthyl)benzaldehyde (58)



$C_{21}H_{26}O_3$
M.W.: 326.44 g/mol

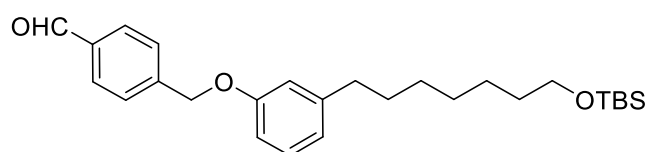
To a solution of **57** (900 mg, 4.33 mmol, 1.0 eq) in dry DMF (30 mL) were added potassium carbonate (1.80 g, 13 mmol, 3.0 eq) and 4-bromométhylbenzaldehyde (1.29 g, 6.50 mmol, 1.5 eq). The mixture was stirred 5h at 80°C under argon. After cooling to room temperature, the mixture was quenched with water (50 mL). The mixture extracted with ethyl acetate (3 x 50 mL) and the combined organic layers were washed with brine (40 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by chromatography using heptane/ethyl acetate 3/7 v/v as eluent. The compound was further purified by C18 flash chromatography using H₂O/ACN 1/1 v/v as eluent to afford **58** as a colorless oil (400 mg, 29%).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 10.02 (s, 1H, CHO), 7.91 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, 2*H*_{ar}), 7.61 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, 2*H*_{ar}), 7.20 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, 1*H*_{ar}), 6.80 (m, 3H, 3*H*_{ar}), 5.14 (s, 2H, CH₂), 3.64 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂), 2.58 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, CH₂), 1.58 (m, 4H, 2CH₂), 1.34 (m, 6H, 3CH₂).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 191.9 (CHO), 158.4 (C_{ar}), 144.7 (C_{ar}), 144.3 (C_{ar}), 135.9 (C_{ar}), 130.0 (2C_{ar}), 129.3 (C_{ar}), 127.5 (2C_{ar}), 121.6 (C_{ar}), 115.1 (C_{ar}), 111.7 (C_{ar}), 69.1 (CH₂), 63.0 (CH₂), 35.9 (CH₂), 32.8 (CH₂), 31.2 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.2 (CH₂), 25.7 (CH₂).

LC/MS: t_R = 4.96 min.; m/z: 327.21 [M+H]⁺.

4-((3-(7-((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)heptyl)phenoxy)méthyl)benzaldehyde (**59**)



C₂₇H₄₀O₃Si
M.W.: 440.70 g/mol

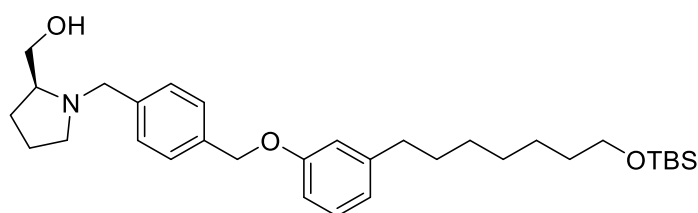
To a solution of **58** (300 mg, 0.92 mmol, 1.0 eq) in dry DCM (5 mL) were added imidazole (95 mg, 1.40 mmol, 1.5 eq) and TBSCl (151 mg, 1.00 mmol, 1.1 eq). The solution was stirred overnight at room temperature under argon. The mixture was quenched with an aqueous solution of HCl (0.1 M, 20 mL), the phases were separated and the aqueous layer was extracted with DCM (2 x 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by chromatography using heptane/ethyl acetate 9/1 v/v as eluent to afford **59** as a colorless oil (210 mg, 53%).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 10.02 (s, 1H, CHO), 7.90 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, 2*H*_{ar}), 7.61 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, 2*H*_{ar}), 7.20 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H, *H*_{ar}), 6.83-6.76 (m, 3H, 3*H*_{ar}), 5.14 (s, 2H, CH₂), 3.59 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂), 2.58 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂), 1.65-1.47 (m, 4H, 2CH₂), 1.32 (m, 6H, 3CH₂), 0.89 (s, 9H, 3CH₃), 0.05 (s, 6H, 2CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 191.9 (CHO), 158.4 (C_{ar}), 144.8 (C_{ar}), 144.3 (C_{ar}), 135.9 (C_{ar}), 130.0 (2C_{ar}), 129.3 (C_{ar}), 127.5 (2C_{ar}), 121.6 (C_{ar}), 115.1 (C_{ar}), 111.7 (C_{ar}), 69.1 (CH₂), 63.0 (CH₂), 36.0 (CH₂), 32.9 (CH₂), 31.3 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.2 (CH₂), 26.0 (3CH₃), 25.7 (CH₂), 18.4 (C), -5.4 (2CH₃).

LC/MS: t_R = 8.12 min.; m/z: 441.27 [M+H]⁺.

(S)-(1-(4-((3-(7-((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)heptyl)phenoxy)méthyl)benzyl)pyrrolidin-2-yl)methanol (60)



C₃₂H₅₁NO₃Si
M.W.: 525.85 g/mol

To a solution of **59** (300 mg, 0.68 mmol, 1.0 eq) in dry DCM (9 mL) were added (*S*)-pyrrolidinemethanol (83 mg, 0.82 mmol, 1.2 eq) and sodium triacetoxyborohydride (212 mg, 1.00 mmol, 1.5 eq). The solution was stirred overnight at room temperature under argon. The mixture was quenched with water (10 mL), the phases were separated and the aqueous layer was extracted with DCM (2 x 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by chromatography using DCM/MeOH 95/5 v/v as eluent to afford **60** as a colorless oil (300 mg, 84%).

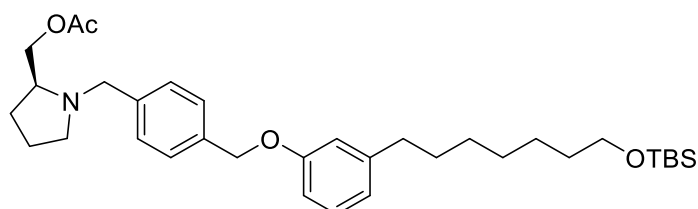
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.40 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, 2*H*_{ar}), 7.34 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, 2*H*_{ar}), 7.19 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, *H*_{ar}), 6.80 (m, 3H, 3*H*_{ar}), 5.03 (s, 2H, CH₂), 4.01 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H, CH₂), 3.68 (dd, *J* = 11.0 Hz, 4.0 Hz, 1H, CH₂), 3.59 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂), 3.46 (m, 2H, CH₂), 3.03-2.81 (m, 2H, CH₂), 2.58 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, CH₂), 2.34 (q, *J* = 8.4 Hz, 1H, CH), 1.98-1.80 (m, 2H, CH₂), 1.78-1.46 (m, 6H, 3CH₂), 1.32 (m, 7H, 3CH₂/CH), 0.88 (s, 9H, 3CH₃),

0.04 (s, 6H, 3CH₃) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 158.9 (C_{ar}), 144.6 (C_{ar}), 138.3 (C_{ar}), 136.3 (C_{ar}), 129.2 (CH_{ar}), 129.0 (2CH_{ar}), 127.7 (2CH_{ar}), 121.2 (CH_{ar}), 115.1 (CH_{ar}), 111.7 (CH_{ar}), 69.7 (CH₂), 64.6 (CH₂), 63.3 (CH₂), 61.7 (CH), 58.3 (CH₂), 54.4 (CH₂), 36.0 (CH₂), 32.9 (CH₂), 31.3 (CH₂), 29.3 (2CH₂), 27.6 (CH₂), 26.0 (3CH₃), 25.8 (CH₂), 23.5 (CH₂), 18.4 (C), -5.2 (2CH₃) ppm.

LC/MS: t_R = 5.14 min.; m/z: 526.39 [M+H]⁺.

(S)-(1-(4-((3-(7-((tert)-butyldiméthylsilyloxy)heptyl)phenoxy)méthyl)benzyl)pyrrolidin-2-yl)méthyl acetate (61)



C₃₄H₅₃NO₄Si
M.W.: 567.89 g/mol

To a solution of **60** (300 mg, 0.57 mmol, 1.0 eq) in dry DCM (5 mL) were added pyridine (134 μL, 1.70 mmol, 3.0 eq) and acetic anhydride (115 μL, 1.14 mmol, 2.0 eq) at 0°C under argon. The mixture was allowed to warm up to room temperature and was stirred for 6h. The mixture was slowly quenched by addition of a saturated aqueous solution of ammonium chloride (10 mL). The phases were separated and the aqueous layer was extracted with DCM (2 x 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (10 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by chromatography using heptane/ethyl acetate 8/2 v/v as eluent to afford **61** as a yellow oil (270 mg, 84%).

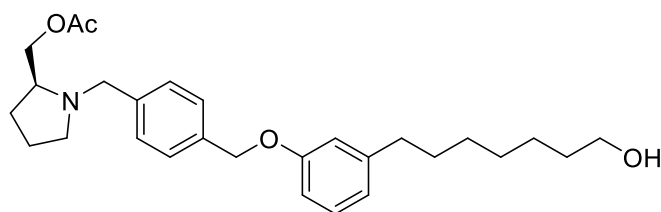
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.38 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, 2H_{ar}), 7.33 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, 2H_{ar}), 7.18 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H_{ar}), 6.80 (m, 3H, 3H_{ar}), 5.02 (s, 2H, CH₂), 4.07 (m, 3H, CH₂ + 1 H of CH₂), 3.59 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂), 3.42 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H, 1 H of CH₂), 2.96-2.78 (m, 2H, CH₂), 2.57 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂), 2.24 (q, *J* = 7.6 Hz, 1H, CH), 2.06 (s, 3H, CH₃), 1.94 (m, 1H, 1 H of CH₂), 1.75-1.46 (m, 7H, 3CH₂ + 1H of CH₂), 1.32 (m, 6H, 3CH₂), 0.88 (s, 9H, 3CH₃), 0.04 (s, 6H, 3CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): 171.1 (C), 158.9 (C_{ar}), 144.6 (C_{ar}), 139.3 (C_{ar}), 135.8 (C_{ar}), 129.2 (CH_{ar}), 129.0 (2CH_{ar}), 127.5 (2CH_{ar}), 121.1 (CH_{ar}), 115.2 (CH_{ar}), 111.7 (CH_{ar}), 69.8

(CH₂), 67.1 (CH₂), 63.3 (CH₂), 61.8 (CH), 59.1 (CH₂), 54.4 (CH₂), 36.0 (CH₂), 32.9 (CH₂), 31.3 (CH₂), 29.3 (2CH₂), 28.4 (CH₂), 26.0 (3CH₃), 25.8 (CH₂), 23.0 (CH₂), 21.0 (CH₃), 18.4 (C), -5.2 (2CH₃) ppm.

LC/MS: $t_R = 5.13$ min.; m/z : 568.44 [M+H]⁺.

(S)-(1-(4-((3-(7-hydroxyheptyl)phenoxy)méthyl)benzyl)pyrrolidin-2-yl)méthyl acetate (62)



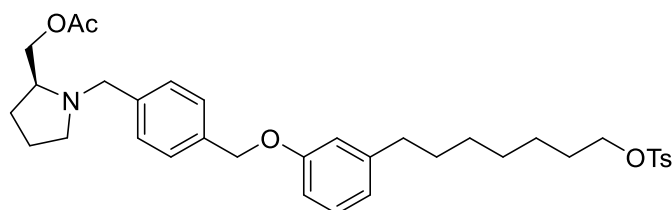
C₂₈H₃₉NO₄
M.W.: 453.62 g/mol

To a solution of **61** (220 mg, 0.39 mmol, 1.0 eq) in dry THF (3 mL) was added a 1M solution of TBAF (420 μ L, 0.42 mmol, 1.1 eq) in THF. The mixture was stirred 8h at room temperature under argon. THF was removed under vacuum and the residue was partitioned between water (10 mL) and ethyl acetate (10 mL). The phases were separated and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (2 x 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (15 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by chromatography using heptane/ethyl acetate 1/1 v/v as eluent to afford **62** as a colorless oil (170 mg, 94%).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.38 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, 2H_{ar}), 7.33 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, 2H_{ar}), 7.18 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H_{ar}), 6.80 (m, 3H, 3H_{ar}), 5.02 (s, 2H, CH₂), 4.07 (m, 3H, CH₂ + 1 H of CH₂), 3.63 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, CH₂), 3.42 (d, $J = 13.1$ Hz, 1H, 1 H of CH₂), 2.96-2.78 (m, 2H, CH₂), 2.57 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, CH₂), 2.24 (q, $J = 7.6$ Hz, 1H, CH), 2.06 (s, 3H, CH₃), 1.94 (m, 1H, 1 H of CH₂), 1.75-1.51 (m, 7H, 3CH₂ + 1H of CH₂), 1.32 (m, 6H, 3CH₂).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 171.2 (C), 158.9 (C_{ar}), 144.5 (C_{ar}), 139.3 (C_{ar}), 135.8 (C_{ar}), 129.2 (CH_{ar}), 129.0 (2CH_{ar}), 127.5 (2CH_{ar}), 121.1 (CH_{ar}), 115.2 (CH_{ar}), 111.7 (CH_{ar}), 69.8 (CH₂), 67.2 (CH₂), 63.0 (CH₂), 61.8 (CH), 59.2 (CH₂), 54.4 (CH₂), 36.0 (CH₂), 32.8 (CH₂), 31.2 (CH₂), 29.3 (2CH₂), 28.4 (CH₂), 25.7 (CH₂), 22.9 (CH₂), 21.0 (CH₃) ppm.

LC/MS: $t_R = 3.84$ min.; m/z : 454.24 [M+H]⁺.

(S)-1-(4-((3-(7-(tosyloxy)heptyl)phenoxy)méthyl)benzyl)pyrrolidin-2-yl)méthyl acetate (63)

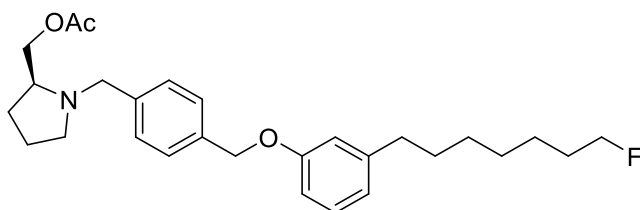
$C_{35}H_{45}NO_6S$
M.W.: 607.81 g/mol

To a solution of **62** (150 mg, 0.33 mmol, 1.0 eq) in DCM (1.5 mL) were added tosyl chloride (76 mg, 0.40 mmol, 1.2 eq) and triethylamine (66 μ L, 0.50 mmol, 1.5 eq). The mixture was stirred 10h at room temperature under argon. The mixture was quenched with water (10 mL) and diluted with DCM (10 mL). The phases were separated and the aqueous layer was extracted with DCM (2 x 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (15 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum. The mixture was purified by chromatography using heptane/ethyl acetate 1/1 v/v as eluent to afford **63** as a colorless oil (110 mg, 55%).

1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.78 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, $2H_{ar}$), 7.35 (m, 6H, $6H_{ar}$), 7.33 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, $2H_{ar}$), 7.18 (dd, $J = 9.0$ Hz, 7.8 Hz, 1H, H_{ar}), 6.78 (m, 3H, $3H_{ar}$), 5.03 (s, 2H, CH_2), 4.07 (m, 3H, $CH_2 + 1H$ of CH_2), 3.63 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, CH_2), 3.42 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H, 1H of CH_2), 2.96-2.78 (m, 2H, CH_2), 2.54 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, CH_2), 2.44 (s, 3H, CH_3), 2.24 (q, $J = 7.6$ Hz, 1H, CH), 2.06 (s, 3H, CH_3), 1.99-1.89 (m, 1H, 1H of CH_2), 1.78-1.46 (m, 7H, $3CH_2 + 1H$ of CH_2), 1.32 (m, 6H, $3CH_2$).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 171.2 (C), 158.9 (C_{ar}), 144.6 (C_{ar}), 144.3 (C_{ar}), 139.3 (C_{ar}), 135.7 (C_{ar}), 133.2 (C_{ar}), 129.8 ($2CH_{ar}$), 129.2 (CH_{ar}), 129.0 ($2CH_{ar}$), 127.9 ($2CH_{ar}$), 127.5 ($2CH_{ar}$), 121.1 (CH_{ar}), 115.2 (CH_{ar}), 111.7 (CH_{ar}), 70.6 (CH_2), 69.8 (CH_2), 67.1 (CH_2), 61.8 (CH), 59.2 (CH_2), 54.4 (CH_2), 35.9 (CH_2), 31.2 (CH_2), 29.1 (CH_2), 28.8 ($2CH_2$), 28.4 (CH_2), 25.3 (CH_2), 23.0 (CH_2), 21.6 (CH_3), 21.0 (CH_3).

ESI-HRMS: m/z: 608.3034 [$M+H$] $^+$ (calculated for $C_{35}H_{46}NO_6S$: 608.3046)

(S)-(1-(4-((3-(7-fluoroheptyl)phenoxy)méthyl)benzyl)pyrrolidin-2-yl)méthyl acetate (64)

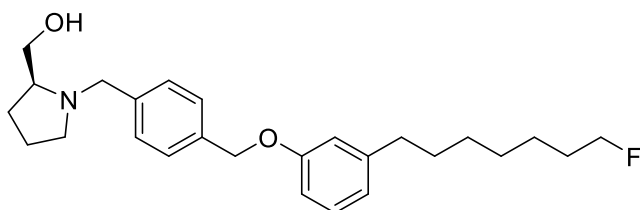
$C_{28}H_{38}FNO_3$
M.W.: 455.61 g/mol

To a solution of **63** (50 mg, 0.08 mmol, 1.0 eq) in THF (0.5 mL) was added a 1M solution of TBAF (90 μ L, 0.09 mmol, 1.1 eq). The mixture was stirred for 15h at room temperature under argon. When the reaction is completed, it was concentrated under vacuum. The residue was then purified on silica gel chromatography using heptane/ethyl acetate 8/2 as eluent to afford **64** (33 mg, 90 %) as a yellow oil.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.38 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, $2H_{ar}$), 7.33 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, $2H_{ar}$), 7.19 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H_{ar}), 6.79 (m, 3H, $3H_{ar}$), 5.02 (s, 2H, CH_2), 4.43 (td, $J_{\text{H-F}} = 47.5$ Hz, $J = 6.3$ Hz, 2H, CH_2), 4.07 (m, 3H, $\text{CH}_2 + 1$ H of CH_2), 3.42 (d, $J = 13.4$ Hz, 1H, 1 H of CH_2), 2.96-2.78 (m, 2H, CH_2), 2.57 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, CH_2), 2.24 (q, $J = 8.3$ Hz, 1H, CH), 2.06 (s, 3H, CH_3), 1.94 (m, 1H, 1 H of CH_2), 1.75-1.58 (m, 7H, $3\text{CH}_2 + 1$ H of CH_2), 1.36 (m, 6H, 3CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 171.2 (C), 158.9 (C_{ar}), 144.5 (C_{ar}), 139.3 (C_{ar}), 135.7 (C_{ar}), 129.2 (CH_{ar}), 129.0 (2CH_{ar}), 127.5 (2CH_{ar}), 121.1 (CH_{ar}), 115.2 (CH_{ar}), 111.7 (CH_{ar}), 84.2 (d, $J_{\text{C-F}} = 172$ Hz, CH_2), 69.8 (CH_2), 67.2 (CH_2), 61.8 (CH), 59.2 (CH_2), 54.4 (CH_2), 36.0 (CH_2), 31.2 (CH_2), 30.4 (d, $J_{\text{C-F}} = 18$ Hz, CH_2), 29.2 (CH_2), 29.1 (CH_2), 28.4 (CH_2), 25.1 (d, $J = 6$ Hz, CH_2), 22.9 (CH_2), 21.0 (CH_3) ppm.

LC/MS: $t_R = 4.18$ min.; $m/z: 456.32$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(S)-(1-(4-((3-(7-fluoroheptyl)phenoxy)méthyl)benzyl)pyrrolidin-2-yl)méthanol (FH-SK1)

$C_{26}H_{36}FNO_2$
M.W.: 413.58 g/mol

To a solution of **64** (18 mg, 0.03 mmol, 1.0 eq) in dry MeOH (0.2 mL) under argon was added a 1M solution of MeONa (45 μ L, 0.05 mmol, 1.7 eq) dropwise. The mixture was stirred 8h at room temperature. Then, the mixture was concentrated under vacuum and the residue was partitioned between ethyl acetate (5 mL) and water (5 mL). The organic phase was extracted 3 times with ethyl acetate (3 x 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (10 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum to afford the desired product (12 mg, 92%) as a yellow oil.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.67 (d, J = 8.0 Hz, 2H, $2H_{ar}$), 7.52 (d, J = 8.0 Hz, 2H, $2H_{ar}$), 7.19 (t, J = 7.8 Hz, 1H, H_{ar}), 6.79 (m, 3H, $3H_{ar}$), 5.01 (s, 2H, CH_2), 4.43 (td, J_{H-F} = 47.5 Hz, J = 6.3 Hz, 2H, CH_2), 4.30 (d, J = 12.0 Hz, 1H, 1H of CH_2), 4.19 (d, J = 12.0 Hz, 1H, 1H of CH_2), 3.86 (d, J = 4.2 Hz, 2H, CH_2), 3.58 (m, 2H, CH_2), 2.96 (m, 1H, 1H of CH_2), 2.58 (t, J = 7.6 Hz, 2H, CH_2), 2.17 (m, 1H, 1H of CH_2), 2.08 (q, J = 8.3 Hz, 1H, CH), 1.97 (m, 1H, 1H of CH_2), 1.73-1.58 (m, 4H, $2CH_2$), 1.36 (m, 6H, $3CH_2$), 1.25 (m, 4H, $2CH_2$).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 171.2 (C), 158.9 (C_{ar}), 144.5 (C_{ar}), 139.3 (C_{ar}), 135.7 (C_{ar}), 129.2 (CH_{ar}), 129.0 ($2CH_{ar}$), 127.5 ($2CH_{ar}$), 121.1 (CH_{ar}), 115.2 (CH_{ar}), 111.7 (CH_{ar}), 84.2 (d, J_{C-F} = 172 Hz, CH_2), 69.8 (CH_2), 67.2 (CH_2), 61.8 (CH), 59.2 (CH_2), 54.4 (CH_2), 36.0 (CH_2), 31.2 (CH_2), 30.4 (d, J_{C-F} = 18 Hz, CH_2), 29.2 (CH_2), 29.1 (CH_2), 28.4 (CH_2), 25.1 (d, J_{C-F} = 6 Hz, CH_2), 22.9 (CH_2), 21.0 (CH_3) ppm.

ESI-HRMS: m/z : 414.2800 [$M+H$]⁺ (calculated for C₂₆H₃₇FNO₂ : 414.2808)

II. Radiochemistry

General information

Radiosyntheses were performed on commercially available synthesizers installed in 7.5 cm lead shielded hotcells. Before each synthesis, the synthesizer was purged from any residual chemicals or solvents leftover (reservoirs, reactors and tubings) from a previous radiotracer production, cleaned with distilled water and dried with acetone and ethanol. Chemicals were purchased from commercial companies and used as received. All cartridges were supplied by Waters (USA) under the Sep-Pak[®] designation.

The radiochemical yield (RCY) was calculated as the ratio of the decay-corrected activity of the radiotracer at the end of the synthesis measured in an ionization chamber (Capintec[®], Berthold, France) over the activity of the starting material ($[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ or $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$) measured by a calibrated gamma counter inside the synthesizer.

II.2. *Automated synthesizers*

II.2.1. **TRACERlab[™] FX FN**

The synoptic of the radiosynthesizer TRACERLab[™] FX FN (GE HealthCare, Sweden) is presented below (Figure exp.1). This one reactor system integrates all the necessary materials for the production of a radiotracer, starting from $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ anions, including phase transfer anion exchange, a built-in HPLC purification with UV and radioactivity detectors and a formulation part by solid-phase extraction. 9 vials are available to add any chemicals, as well as 4 cartridge holders. The synthesis sequence can be user defined in order to produce the desired tracer.

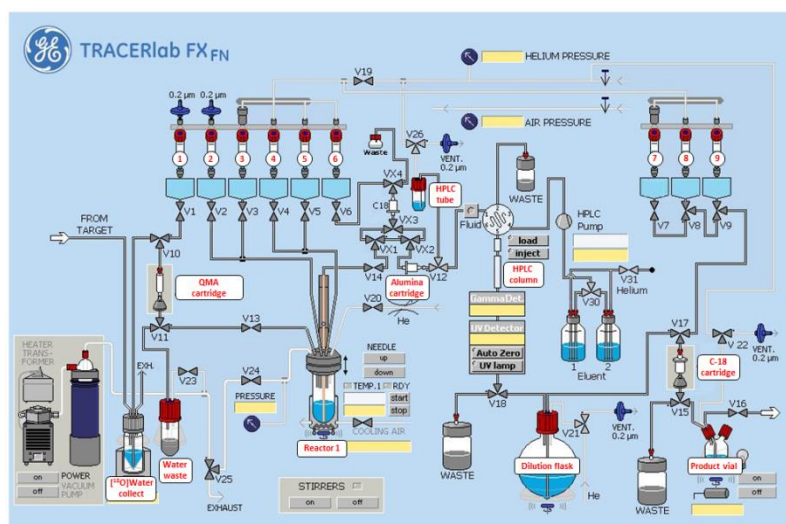


Figure exp.1: Synoptic of the radiosynthesizer TRACERlab™ FX FN

For a typical one-step radiofluorination, the reservoirs and vessels of the module can be filled as depicted in Table exp.1.

Reservoirs	Chemical	Quantity
Reservoir 1	K_{222}/K_2CO_3 15 mg/3.3 mg in ACN/H ₂ O 7/3 v/v	1 mL
Reservoir 3	Precursor in appropriate solvent	3-4 mg in 700 μ L of solvent
Reservoir 4	HPLC eluent	2 mL
Reservoir 5	Eluent	2 mL
Reservoir 7	Distilled water	10 mL
Reservoir 8	Ethanol	2 mL
Reservoir 9	Physiological saline	2 mL
Dilution flask	Distilled water	30 mL
	QMA cartridge	1
	Alumina N cartridge	1
	C18 cartridge	1

Table exp.1: Standard preparation of the TRACERlab™ FX FN synthesizer for one-step radiofluorination

II.2.2.

TRACERlab™ FX N Pro

The module TRACERlab™ FX N Pro (GE HealthCare, Sweden) is also used to perform radiofluorination reactions with fluorine-18. The synoptic of the radiosynthesizer is presented below (Figure exp.2). It is similar to the TRACERlab™ FX FN presented in figure exp.2 but it integrates two reactors and additional reservoirs to perform multistep syntheses.

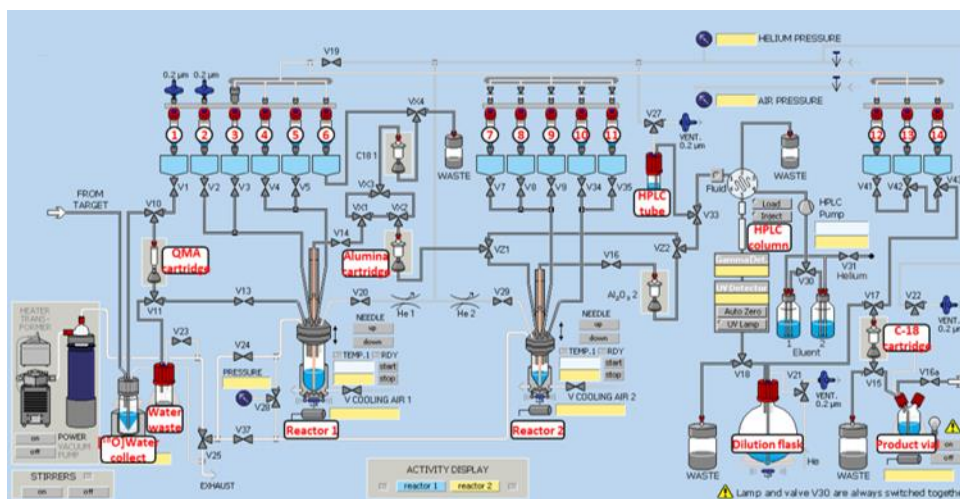


Figure exp.2: Synoptic of the TRACERlab™ FX N Pro radiosynthesizer

Trasis AllInOne (AIO)

II.2.3.

An example of synoptic of the Trasis (Belgium) AllInOne radiosynthesizer is presented below (Figure exp.3). This automated module is equipped with thirty-six rotation mechanisms with multiple positions, two heating reactors and seven radioactivity detectors. It also incorporates an integrated HPLC system equipped with a UV and a gamma detector. AIO operates using single use cassettes and reagent sets, which are compatible with Good Manufacturing Practices compliance and prevent cross-contamination. Bulk components enable the assembly of the cassettes for research-related purposes. The software displays the cassette layout and the real-time movements of the system during the production of the tracer.

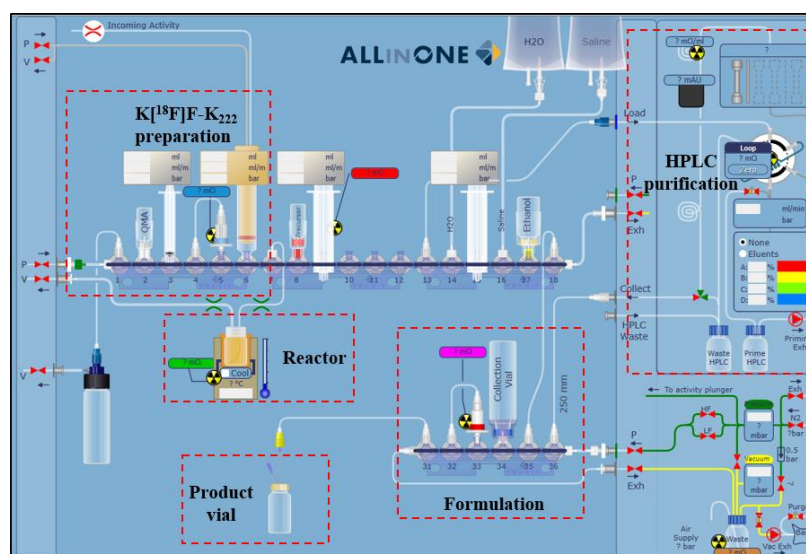


Figure exp.10: Example of synoptic for the Trasis AllInOne radiosynthesizer for one-step radiofluorination

A standard custom-build cassette for one-step radiofluorination can be built with a series of four manifolds containing 6 valves each. Several components are connected to the cassette such as spikes, SPE cartridges, syringes and tubings. Glass vials are connected to the spikes and can be filled with the typical reagents list presented in table exp.2.

Position	Reagent/component	Quantity
2	K ₂₂₂ /K ₂ CO ₃ 15 mg/3.3 mg in ACN/H ₂ O 8/2 v/v	300 µL
5	QMA-carbonate cartridge	1
8	Precursor in appropriate solvent	3-4 mg in 700 µL of solvent
14	Distilled water	-
16	Saline	-
17	Ethanol	10 mL
33	C18 cartridge	1
34	Collection vial	1

Table exp.2: Typical reagent list for a one-step radiofluorination using the Trasis AllInOne radiosynthesizer

II.2.4.

TRACERLab™ FX C Pro

The synoptic of the TRACERLab™ FX C Pro (GE HealthCare, Sweden) radiosynthesizer is presented below (Figure exp.4). This automated system for the production of carbon-11 tracers enables the formation of [¹¹C]CH₃I or [¹¹C]CH₃OTf from cyclotron-produced [¹¹C]CO₂ or [¹¹C]CH₄ by the gaseous recirculating process described by Larsen *et al.*⁴⁰ and Jewett.⁴⁴ It

includes a reactor able to be heated up to 200°C and an HPLC system equipped with a UV and radioactivity detectors as well as a SPE formulation part and 6 vials for chemicals.

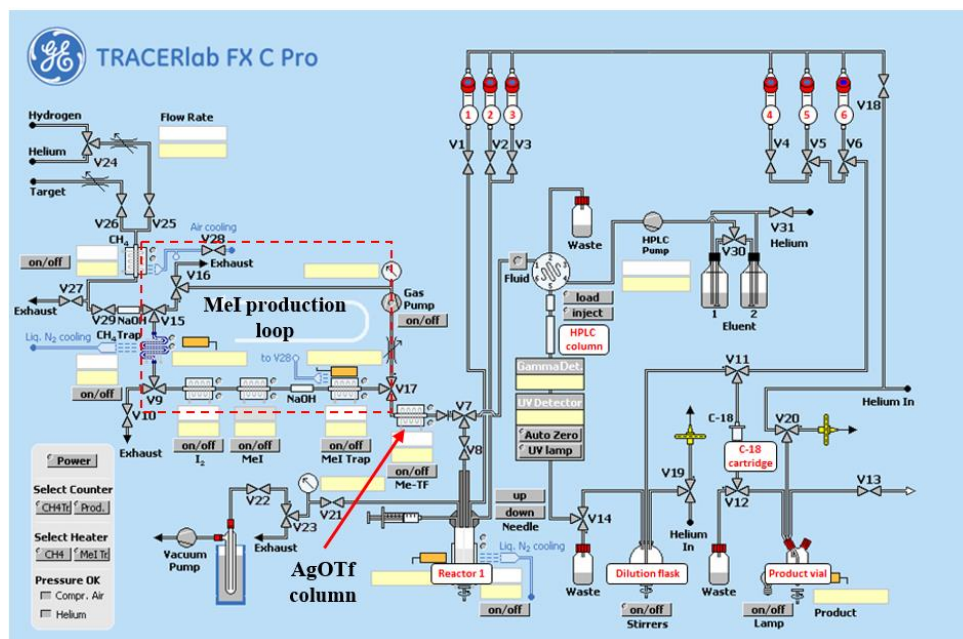


Figure exp.4: Synoptic of the TRACERLab™ FX C Pro radiosynthesizer for one-step radiométhylation

For a typical one-step radiométhylation, the reservoirs and vessels of the module can be filled as depicted in Table exp.3.

Reservoir	Compound	Quantity
Reservoir 3	HPLC eluent	0.5 mL
Reservoir 4	Distilled water	10 mL
Reservoir 5	Ethanol	2 mL
Reservoir 6	Physiological saline	2 mL
	C18 cartridge	1
Dilution flask	Distilled water	30 mL
Reactor	Precursor, base, organic solvent	1mg of precursor, 1-2 eq. of base, 300 µL of solvent

Table exp.3: Typical preparation of the TRACERLab™ FX C Pro synthesizer for one-step radiométhylation

Synthra MeI_{plus} Research

The modified scheme of the Synthra (Germany) MeI_{plus} Research radiosynthesizer for direct

bubbling of $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ is presented below (Figure exp.5). Originally, this automated system is designed for the production of carbon-11 labeled compound based on the generation of $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ or $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ following the same recirculating process as the TRACERlabTM FX C Pro. It has been modified to allow direct bubbling of the cyclotron produced $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ into the reactor. This module displays two reactors, an integrated radio/UV-HPLC system and formulation device. 9 vials are available for addition of chemicals. This module is provided with its own software.

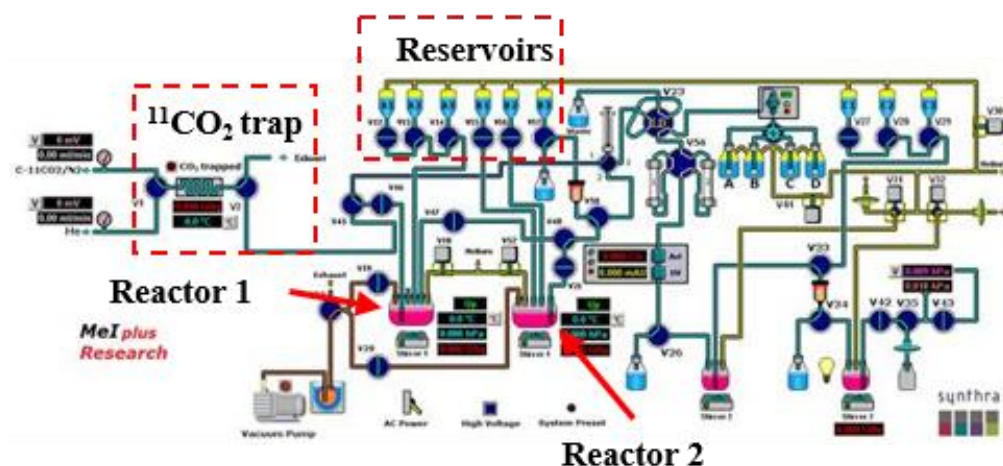


Figure exp.5: Modified synoptic of the Synthra MeIplus Research radiosynthesizer for direct bubbling of $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$

As an example, the preparation of the module to achieve the radiosynthesis of $[^{11}\text{C}]\mathbf{24}$ is described in Table exp.4.

Reservoir	Compound	Quantity
Reservoir 1	HCl solution	250 μL of HCl solution (100 μL of a 4M HCl solution in dioxane diluted with 800 μL of DMF)
Reservoir 2	Precursor 25 , DIPEA in DMF	3.9 mg of 25 , 25 μL of DIPEA in DMF (150 μL)
Reservoir 3	HATU in DMF	6.5 mg of HATU in DMF (150 μL)
Reservoir 4	ACN/H ₂ O 1/1 v/v mixture	2 mL
Reactor 1	Vinyl magnesium bromide in THF	200 μL of a 1M solution vinyl magnesium bromide in THF (400 μL)

Table exp.4: Example of preparation of the MeIplus Research synthesizer for the radiosynthesis of $[^{11}\text{C}]\mathbf{24}$

Iphase C-11 Pro2

The synoptic of the iPhase Technologies (Australia) C-11 Pro2 radiosynthesizer is presented below (Figure exp.6). This synthesizer is built to produce carbon-11 radiotracers by the “wet” chemistry method developed by Langström and Lundqvist.³⁹ [^{11}C]CO₂ is trapped at room temperature on 5 Å molecular sieves and converted into [^{11}C]CH₃I by the use of LiAlH₄ and HI. [^{11}C]CH₃I can be transformed into [^{11}C]CH₃OTf using an AgOTf column heated at 200 °C. This module is equipped with a HPLC purification system and a SPE reformulation part using a disposable kit.

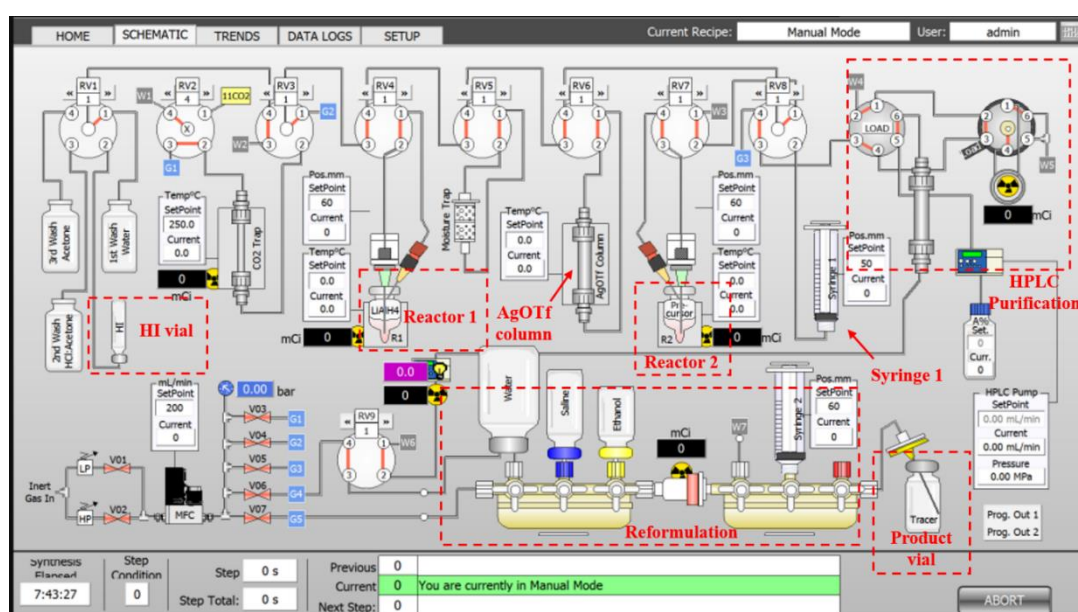


Figure exp.6: Synoptic of the radiosynthesizer iPhase C-11 Pro 2

For a typical one-step radiométhylation, the reservoirs and vessels of the module can be filled as depicted in Table exp.5.

Reservoir	Compound	Quantity
Reactor 1	LiAlH ₄ solution	LiAlH ₄ 1M in THF (150 µL)
Reactor 2	Precursor and base in organic solvent	1 mg of 4 , 1-2 eq mg of base in 300 µL of solvent
HI vial	HI _{aq} (53% wt)	300 µL
Syringe 1	HPLC eluent	1 mL

Table exp.5: Typical preparation of the iPhase C11 Pro2 synthesizer for one-step radiométhylation

Analytical methods

Quality Control

Quality control was realized by analytical HPLC performed using a 717plus Autosampler system, a 1525 binary pump, a 2996 photodiode array detector (Waters, USA) and a Flowstar LB 513 (Berthold, France) gamma detector. The system was operated with the Empower 3 (Waters, USA) software. HPLC were realized on a reverse phase analytical Symmetry® C18 (150 x 3.9 mm, 5 µm, Waters) column using a mixture of H₂O/CH₃CN/PicB7® as eluent. The chemical identification of the peak was assessed by comparing the retention time of the radiotracer with the retention time of the non-radioactive reference (t_{Rref}). For acceptance, the retention time must be within the $t_{\text{Rref}} \pm 10\%$ range. Radiochemical and chemical purities were calculated as the ratio of the area under the peak (AUC) of the radiotracer peak over the sum of the AUCs of all other peaks on gamma and UV chromatograms respectively. Molar activity (MA) was calculated as the ratio of the activity of the collected peak of the radioatracer measured in an ionization chamber (Capintec®, Berthold, France) over the molar quantity of the non-radioactive compound determined using a calibration curve. MA is calculated as the mean value of three consecutive runs.

II.3.2.

Thin Layer Chromatography

Thin Layer Chromatography (TLC) was performed on pre-coated plates of silica gel 60F254 (Merck, USA) and eluted with ethyl acetate or a mixture of MeOH/DCM. Radioactive compounds were detected using a MiniScan and Flow-Count radioactive detection system (Bioscan, France) and Chromeleon software (Thermo Scientific, USA).

II.4.

II.4.1.

Fluorine-18 radiochemistry

Fluorine-18 production

No-carrier-added aqueous [¹⁸F]fluoride anion was produced via the ¹⁸O(p,n)¹⁸F nuclear reaction by irradiation of a 2 mL [¹⁸O]water target (> 98%-enriched, Rotem, Israël) on a Cyclone 18/9 cyclotron (18 MeV proton beam, IBA) and was transferred to the appropriate hotcell. Target hardware: commercial, 2 mL, two-port, stainless steel target holder equipped with a domed-end

niobium cylinder insert. Target to hot cell liquid-transfer system: 60 m PTFE line (0.8 mm internal diameter ; 1/16 inch external diameter), 2.0 bar helium drive pressure, transfer time 3-6 min. Typical production of [¹⁸F]fluoride ion at the end of bombardment for a 25 μA·h, 30 minutes irradiation: 27-30 GBq.

Experimental procedures for the automated production of fluorine-18 radiotracers

Radio-synthesis of [¹⁸F]PEG-CP31398

[¹⁸F]Fluoride (15-20 GBq) in H₂[¹⁸O]O was recovered in the AIO synthesizer and passed through a Sep-Pak[®] light QMA-carbonate cartridge, pre-conditioned with 2 mL of KHCO₃ (1M) and rinsed with 10 mL H₂O, where [¹⁸F]fluoride was trapped and H₂[¹⁸O]O was collected for recycling. The QMA-carbonate cartridge was then flushed with nitrogen gas flow. The trapped [¹⁸F]fluoride was eluted from the QMA-carbonate cartridge into the reactor with 300 μL of the K₂₂₂/K₂CO₃ solution (K₂₂₂/K₂CO₃ 15 mg/3.3 mg in ACN/H₂O 8/2 v/v). The solvent was removed under a stream of nitrogen gas flow at 110 °C for 10 min to give the dried K[¹⁸F]F-K₂₂₂ complex. The reactor was then cooled at 50 °C and radiofluorination was carried out by addition of compound 9 (4.0 mg, 6,8 μmol) in DMSO (700 μL). The reaction was performed at 140 °C for 5 min in a closed reactor. After this heating period, the reactor was cooled to 50 °C and the reaction mixture was diluted with water (5 mL). The crude solution was transferred to the HPLC injection loop through an Alumina N cartridge. Purification was performed by semi-preparative HPLC on a reverse phase Zorbax[®] SB-C18 (250 x 9.4 mm, 5 μm) column (Agilent, USA) using a mixture of water, acetonitrile and trifluoroacetic acid as eluent (75 / 25 / 0.1, v / v / v) at a flowrate of 5 mL/min. UV detection was carried out at 254 nm. The fraction containing the labelled product [¹⁸F]PEG-CP31398 was collected and diluted in water (30mL). The diluted solution was passed through a Sep-Pak[®] Plus C18 cartridge (pre-conditioned with 2 mL of EtOH and rinsed with 10 mL of H₂O). The [¹⁸F]PEG-CP31398 compound was trapped on the cartridge, rinsed with 10 mL of water and finally eluted with ethanol (1.5 mL) and diluted with saline (1.5 mL). Quality control was performed according to the general procedure using a mixture of H₂O/ACN 7/3 v/v as eluent and UV detection at 254 nm. [¹⁸F]PEG-CP31398 was produced in 10% ± 4 RCY and 80 ± 39 GBq/μmol MA within 60 min with a chemical and radiochemical purity >99% (n = 4).

Radiosynthesis of [¹⁸F]F-CP31398

Radiosynthesis was carried out using a TRACERlab™ FX N Pro module. [¹⁸F]F⁻ (9-15 GBq) was trapped on an ion exchange resin QMA light, pre-conditioned with 2 mL of TfOH (10 mg/mL) and rinsed with 10 mL H₂O, and eluted with a solution containing 500 μL of CH₃CN, 450 μL of an aqueous TfOK solution (10 mg/mL) and 50 μL of an aqueous K₂CO₃ solution (1 mg/mL). The resulting complex was dried upon heating at 60 °C for 7 min under vacuum and a stream of helium followed by heating at 120 °C for 5 min under vacuum only. Upon cooling to 70 °C, a solution of the aryltin precursor **17** (4 mg, 7.6 μmol, 1.0 eq) and Cu(OTf)₂Py₄ (12 mg, 17.3 μmol, 2.3 eq) in 500 μL of DMI was added and the mixture was heated at 110 °C for 20 min. The mixture was diluted with ACN/H₂O (3/7 v/v, 2 mL). Quality control was performed on the crude product according to the general procedure using a mixture of H₂O/ACN 7/3 v/v as eluent and UV detection at 254 nm.

Radiosynthesis of [¹⁸F]FH-SK1

Radiosynthesis was carried out using a TRACERLab™ FX N Pro module. [¹⁸F]F⁻ (15-25 GBq) was trapped on an ion exchange resin Sep-Pak® light QMA-carbonate cartridge (Waters, USA), pre-conditioned with 2 mL of KHCO₃ (1M) and rinsed with 10 mL H₂O, and eluted to the reactor using a K₂CO₃ (2 mg) and K₂₂₂ (11-15 mg) solution in a ACN/H₂O (7/3 v/v) mixture (1 mL). The resulting complex was dried upon heating at 60 °C for 7 min under vacuum and a stream of helium followed by heating at 120 °C for 5 min under vacuum only. Upon cooling to 50°C, a solution of **63** (4 mg, 6.6 μmol) in DMSO (700 μL) was added to the mixture and heated at 110°C for 5 min. Upon cooling to 50°C, 300 μL of an aqueous solution of sodium hydroxide (4M) was added and the mixture was stirred at 100 °C for 5 min. Upon cooling to room temperature, the mixture was diluted with ACN/H₂O/TFA (65/35/0.1, v/v/v, 2 mL). Purification was performed by semi-preparative HPLC on a reverse phase Zorbax® SB-C18 (250 x 9.4 mm, 5 μm) column (Agilent, USA) using a mixture of water, acetonitrile and trifluoroacetic acid as eluent (35/65/0.1, v/v/v) at a flowrate of 5 mL/min. UV detection was carried out at 254 nm. The diluted solution was passed through a Sep-Pak® Plus C18 cartridge (pre-conditioned with 2 mL of EtOH and rinsed with 10 mL of H₂O). The [¹⁸F]FH-SK1 compound was trapped on the cartridge, rinsed with 10 mL of water and finally eluted with ethanol (2.5 mL) and diluted with saline (2.5 mL). Quality control was performed according to the general procedure using a mixture of H₂O/ACN 1/1 v/v as eluent and UV detection at 254 nm. [¹⁸F]FH-SK1 was obtained

with 33 ± 7 % RCY within 80 minutes with a chemical and radiochemical purity > 99 % and an average MA of 41.8 ± 4.0 GBq/ μ mol ($n = 5$).

Carbon-11 radiochemistry

Radioisotope production

No carrier added [^{11}C]CO₂ was produced *via* the $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$ nuclear reaction by irradiation of

II.5. a [^{14}N]N₂ target containing 0.15 - 0.5 % of O₂ on an Cyclone 18/9 cyclotron (18 MeV proton beam, IBA, Belgium) and transferred to the appropriate hot cell containing the radiosynthesizer.

II.5.1 Target hardware: 50 mL, aluminum target holder (135 mm length, 64 mm diameter) (IBA, Belgium). Target to hot cell liquid-transfer system: 60 m stainless steel line (1 / 8 inch external diameter), pressure let-down driven, transfer time 3 to 6 min. Typical production of [^{11}C]CO₂ at the end of bombardment for a 25 μ A, 45 min (19 μ A.h) irradiation: 50-60 GBq.

II.5.2. Experimental procedures for the automated production of [^{11}C]CH₃I and [^{11}C]CH₃OTf

The preparation of [^{11}C]MeI from cyclotron-produced [^{11}C]CO₂ is based on a “recirculating” process first reported by Larsen *et al.*⁴⁰. [^{11}C]CO₂ is trapped at room temperature on molecular sieves 4 Å packed with Shimalite nickel loaded beforehand with hydrogen. Reduction into [^{11}C]CH₄ is realized at 380 °C for 1 min and the gas is released under hydrogen flow (100 mL / min), passed through sicapent® and ascarite® cartridges and trapped at -75 °C on Carbosphere™ 60 / 80 mesh. Upon heating at 80 °C, [^{11}C]CH₄ is released and converted into [^{11}C]CH₃I by reaction with gaseous iodine at 750 °C for 3 min using a recirculation process. [^{11}C]CH₃I is trapped at room temperature on a Porapak™ phase and released at 190 °C under a flow of helium (30 mL/min). Conversion into [^{11}C]MeOTf is realized according to the method of Jewett.⁴⁴ Upon release from Porapak™, [^{11}C]CH₃I is passed through a preheated (200 °C) AgOTf / Carbopack™ 60 / 80 mesh (1/1 w /w) column to instantaneously afford [^{11}C]CH₃OTf.

Radiosynthesis of [^{11}C]CP31398 on TRACERlab™ FX C Pro

[^{11}C]CH₃OTf prepared using the general procedure was bubbled under a stream of He (30 mL/min) into a solution of compound **4** (1 mg) and *t*-BuOK (1 mg) in 2-butanone (300 μ L).

The mixture was heated at 85°C for 5 min. Upon cooling to 60 °C, the mixture was diluted with a mixture of sodium acetate (0.5M) and EtOH (6/4 v/v). Purification was performed by semi-preparative HPLC on a reverse phase Symmetry® C18 (300 x 7.8 mm, 7 µm) column (Waters, USA) using a mixture of sodium acetate (0.5M) and EtOH as eluent (6/4 v/v) at a flowrate of 5 mL/min. UV detection was carried out at 254 nm. [¹¹C]CP31398 was obtained with 42 ± 13% RCY within 40 minutes (n = 6). Quality control was performed according to the general procedure using a mixture of H₂O/ACN 7/3 v/v as eluent and UV detection at 254 nm. [¹¹C]CP31398 was obtained with a chemical and a radiochemical purity > 99% and an average specific activity of 39 ± 12 GBq/µmol (n = 6).

The synthesis of [¹¹C]CP31398 has also been performed using the iPhase C-11 Pro2 module using the same reaction conditions.

Radiosynthesis of [¹¹C]24 on the Synthra MeI_{plus} Research module

[¹¹C]CO₂ was bubbled into a solution of vinylmagnesium bromide (1 M in THF, 200 µL) in THF (400 µL) at 7 mL/min flow rate under a stream of He for 4 minutes. 250 µL of a solution of HCl (4 M in dioxane, 100 µL diluted with 800 µL of DMF) was then added and the reaction stirred for 1 min. A solution of precursor **25** (3.9 mg, 13 µmol) and DIPEA (25 µL) in DMF (150 µL) and a solution of HATU (6.5 mg, 17 µmol) in DMF (150 µL) were added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 10 min. The reaction was then diluted with 1 mL of a mixture of H₂O/ACN (7/3 v/v) and the crude was analyzed by analytical HPLC. Quality control was performed according to the general procedure using a mixture of H₂O/ACN 7/3 v/v as eluent and UV detection at 254 nm. The conversion was measured based on the initial [¹¹C]CO₂ activity.

III.1.

III. Biochemistry

Cell culture

The human cell line HEK-293T was purchased from the American Type Culture Collection. The cells were cultured in DMEM/F12 medium (Gibco, France), supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, France), at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

The human cell line 22RV1 was purchased from the American Type Culture Collection. The cells were cultured in RPMI medium (Gibco, France), supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, France), at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Transfection

10⁶ cells are seeded per 10 cm diameter Petri dish. After 24h, the cells are transfected with a GFP-p53 plasmid (Addgene, #12091, USA) dissolved in Lipofectamine 2000 transfection reagent (ThermoFisher, France). After 24h, cells were analyzed by fluorescence microscopy (Nikon Eclipse Ti, X10, Japan) using FITC filters.

Binding tests

III.3.

Transfected HEK-293T cells (5.10⁵ cells) were exposed to [¹⁸F]PEG-CP31398, with or without 100x molar excess of non-radiolabeled PEG-CP31398 ligand for 1.5 h at 37°C under agitation. Three molar concentrations of [¹⁸F]PEG-CP31398 were tested: 1 nM, 10 nM and 50 nM. After multiple washes, the cell-bounded activity was measured using a Wizard2 gamma counter (PerkinElmer, France).

22RV1 cells (5.10⁵ cells) were exposed to [¹⁸F]FH-SK1, with or without 400x molar excess of PF-543 ligand for 1.5 h at 37°C under agitation. Eight molar concentrations of [¹⁸F]FH-SK1 were tested: (10; 50; 250; 500; 800; 1000 and 2000 nM). After multiple washes, the cell-bounded activity was measured using a Wizard2 gamma counter (PerkinElmer, France). Statistical analysis were performed using a Student test.

III.4.

Gel shift

Samples: 5.10⁵ HEK-293T transfected cells were incubated with [¹⁸F]PEG-CP31398 (50 nM) for 1.5 hours at 37°C. The cells are lysed using lysis buffer (Cell Signaling #9803, USA) supplemented with protease/phosphatase inhibitors (ThermoScientific #78440, France). The solution was centrifuged at 14,000 rpm for 15 min at 4°C.

In parallel, [¹⁸F]PEG-CP31398 is incubated with 1 µg of recombinant human p53 (Sigma Aldrich #p6374, USA) at a final concentration of 50 nM for 1.5 h at 37°C.

Gel Electrophoresis

The two previously described samples are diluted in loading buffer (4X Laemmli Sample Buffer, BIO-RAD) and subjected to gel electrophoresis on a 4-20% non-denaturing gel (BIO-RAD #4561093, USA) at 100V for 120 minutes. Electrophoresis is carried out at 4°C in a non-denaturing buffer (10X Tris-Glycine Buffer, BIO-RAD #1610771, USA) diluted in milliQ water. A size marker (Precision Plus Dual Color, BIO-RAD #1610374, USA) is also loaded onto the gel to determine protein sizes through comparison. Two identical gels are run in parallel.

III.6. Western Blot of gel

Proteins are transferred onto a PolyVinylidene Fluoride membrane using the transfer kit (Bio-RAD #1704157, USA) placed in the Trans-Blot Turbo transfer system (BIO-RAD #1704150, USA) set at 2.5A, 25V for 5 minutes. The membrane is then blocked in 5% BSA TBS-Tween for 1 h at 25°C on a shaker, and finally incubated with p53 primary antibody (Thermo Fisher, #PA5-27822, 1:1000, USA) overnight at 4°C under agitation.

After 3 washes, the membrane is incubated with the secondary antibody (Merck #A0545, 1:10000, USA) for 1 hour at room temperature.

Detection is performed by incubating the membrane with a peroxidase substrate (ECL, BIO-RAD, USA) and visualized using a Vilber imaging system (Vilber Fusion FX, Germany)

Autoradiography of gel

The second gel is placed in contact with a phosphor screen in a cassette (Molecular Dynamics) overnight. Images were acquired at 50 µm resolution with an imager (Storm 860 Molecular Imager, Molecular Dynamics, USA).

Immunohistochemistry

Frozen tumor sections (12 μm) were incubated with the primary antibody rabbit anti-human p53 (Thermo Fisher, #PA5-27822, 1:1000, USA). The following tumors were tested: A431, A549, CT26, H358, H1975, and U87. Subsequently, the slides were incubated with the ^{III.8.}secondary antibody (Merck #A0545, 1:10000, USA) for 1 h at room temperature. Images of labeled tumor sections were captured using the Zeiss AxioCam fluorescence microscope (Carl Zeiss, Germany).

Autoradiography of tumor sections

Tumor sections were incubated either with [¹⁸F]PEG-CP31398 (123.8 \pm 7.1 MBq) or ^{III.9.}[¹¹C]CP31398 (164.4 MBq) according to a previously described protocol.²⁴⁸ Specific binding was assessed using an excess (20.0 μM or 11.5 μM) of unlabeled PEG-CP31398. Sections were incubated for 20 min in Tris Buffer (50 mM) with NaCl (120mM) adjusted to pH 7.4. The unbound excess ligands were removed by two 5-min wash cycles in cold buffer and then a final rinse in cold deionized water. Slides were placed in contact with a phosphor screen in a cassette (Molecular Dynamics, USA) overnight. Images were acquired at 50 μm resolution with an imager (Storm 860 Molecular Imager, Molecular Dynamics, USA).

The same slides were used for Hematoxylin & Eosin staining. Slides were fixed in neutral buffer formalin 10% for 10 min, then washed with distilled water. Slides were stained with haematoxylin (Haematoxylin Harris, Merck, USA) and Eosin Y (Eosin Y alcoholic solution, Merck, USA) according to previously reported protocol.²⁴⁹

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) *Le cancer en chiffres (France et monde) | Fondation ARC pour la recherche sur le cancer.* <https://www.fondation-arc.org/cancer/le-cancer-en-chiffres-france-et-monde>, **2023**.
- (2) Wild, C., Stewart, B., *World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention*, **2014**.
- (3) Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2018**, 68 (6), 394–424.
- (4) *Cancer Tomorrow.*
https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?single_unit=500000&round_numbers=1, **2023**.
- (5) *Cancer today.* <http://gco.iarc.fr/today/home>, **2023**.
- (6) DeVita, V. T. The Evolution of Therapeutic Research in Cancer. *N. Engl. J. Med.* **1978**, 298 (16), 907–910.
- (7) Spatola, C.; Liardo, R. L. E.; Milazzotto, R.; Raffaele, L.; Salamone, V.; Basile, A.; Foti, P. V.; Palmucci, S.; Cirrone, G. A. P.; Cuttone, G.; Russo, A.; Avitabile, T.; Reibaldi, M.; Longo, A.; Broggi, G.; Bonfiglio, V.; Caltabiano, R.; Pergolizzi, S.; Arena, F. Radiotherapy of Conjunctival Melanoma: Role and Challenges of Brachytherapy, Photon-Beam and Protontherapy. *Appl. Sci.* **2020**, 10 (24), 9071.
- (8) Wang, C.; Park, J.; Ouyang, C.; Longmate, J. A.; Tajon, M.; Chao, J.; Lim, D.; Sandhu, J.; Yin, H. H.; Pillai, R.; Gozo, M. C.; Avalos, C.; Egelston, C. A.; Lee, P. P.; Fakih, M. A Pilot Feasibility Study of Yttrium-90 Liver Radioembolization Followed by Durvalumab and Tremelimumab in Patients with Microsatellite Stable Colorectal Cancer Liver Metastases. *The Oncologist* **2020**, 25 (5).
- (9) DeVita, V. T.; Chu, E. A History of Cancer Chemotherapy. *Cancer Res.* **2008**, 68 (21), 8643–8653.
- (10) Schirmacher, V. From Chemotherapy to Biological Therapy: A Review of Novel Concepts to Reduce the Side Effects of Systemic Cancer Treatment (Review). *Int. J. Oncol.* **2019**, 54 (2), 407–419.
- (11) *Panorama des cancers en France – Edition 2022 - ONCORIF.*
<https://www.oncorif.fr/panorama-des-cancers-en-france-edition-2022/>, **2022**
- (12) Nahta, R.; Esteva, F. J. Herceptin: Mechanisms of Action and Resistance. *Cancer Lett.* **2006**, 232 (2), 123–138.

- (13) Apostolova, I.; Wedel, F.; Brenner, W. Imaging of Tumor Metabolism Using Positron Emission Tomography (PET). In *Metabolism in Cancer*; Cramer, T., A. Schmitt, C., Eds.; Recent Results in Cancer Research; Springer International Publishing: Cham, 2016; pp 177–205.
- (14) Moses, W. W. Fundamental Limits of Spatial Resolution in PET. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. Accel. Spectrometers Detect. Assoc. Equip.* **2011**, *648 Supplement 1*, S236–S240.
- (15) Lilleker, J. B.; Hodgson, R.; Roberts, M.; Herholz, K.; Howard, J.; Hinz, R.; Chinoy, H. [¹⁸F]Florbetapir Positron Emission Tomography: Identification of Muscle Amyloid in Inclusion Body Myositis and Differentiation from Polymyositis. *Ann. Rheum. Dis.* **2019**, *78* (5), 657–662.
- (16) Jadvar, H. Radiotheranostics in Prostate Cancer: Introduction and Overview. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57* (Supplement 3), 1S-2S.
- (17) Vagenas, T. P.; Economopoulos, T. L.; Sachpekidis, C.; Dimitrakopoulou-Strauss, A.; Pan, L.; Provata, A.; Matsopoulos, G. K. A Decision Support System for the Identification of Metastases of Metastatic Melanoma Using Whole-Body FDG PET/CT Images. *IEEE J. Biomed. Health Inform.* **2023**, *27* (3), 1397–1408.
- (18) Pimlott, S. L.; Sutherland, A. Molecular Tracers for the PET and SPECT Imaging of Disease. *Chem Soc Rev* **2011**, *40* (1), 149–162.
- (19) Ziegler, S. I. Positron Emission Tomography: Principles, Technology, and Recent Developments. *Nucl. Phys. A* **2005**, *752*, 679–687.
- (20) Arronax. *Combien y a-t-il de cyclotrons à usage médical en France ?*. Arronax Nantes. <https://www.arronax-nantes.fr/gip-arronax/arronax-en-8-questions/combien-y-a-t-il-de-cyclotrons-a-usage-medical-en-france>, **2023**.
- (21) *Société Française de Médecine Nucléaire et Imagerie Moléculaire*. CNP MN. <https://www.cnp-mn.fr/sfmn-accueil/>, **2023**.
- (22) Miele, E.; Spinelli, G. P.; Tomao, F.; Zullo, A.; De Marinis, F.; Pasciuti, G.; Rossi, L.; Zoratto, F.; Tomao, S. Positron Emission Tomography (PET) Radiotracers in Oncology – Utility of ¹⁸F-Fluoro-Deoxy-Glucose (FDG)-PET in the Management of Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC). *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **2008**, *27* (1), 52.
- (23) Nagashima, F.; Nishiyama, R.; Iwao, B.; Kawai, Y.; Ishii, C.; Yamanaka, T.; Uchino, H.; Inazu, M. Molecular and Functional Characterization of Choline Transporter-Like Proteins in Esophageal Cancer Cells and Potential Therapeutic Targets. *Biomol. Ther.* **2018**, *26* (4), 399–408.

- (24) Silveira, M. B.; Ferreira, S. Z.; Carvalho, T. F.; Silva, J. B. da. [¹¹C] Methionine as PET Radiopharmaceutical Produced at CDTN/CNEN; Brazil, **2013**.
- (25) Herholz, K.; Heiss, W.-D. Positron Emission Tomography in Clinical Neurology. *Mol. Imaging Biol.* **2004**, *6* (4), 239–269.
- (26) Orlovskaya, V. V.; Fedorova, O. S.; Krasikova, R. N. Methods for the Synthesis of Fluorine-18-Labeled Aromatic Amino Acids, Radiotracers for Positron Emission Tomography (PET). *Russ. Chem. Bull.* **2015**, *64* (7), 1518–1535.
- (27) Katzenellenbogen, J. A. The Quest for Improving the Management of Breast Cancer by Functional Imaging: The Discovery and Development of 16 α -[¹⁸F]Fluoroestradiol (FES), a PET Radiotracer for the Estrogen Receptor, an Historical Review. *Nucl. Med. Biol.* **2021**, *92*, 24–37.
- (28) Hennrich, U.; Eder, M. [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11: The First FDA-Approved ⁶⁸Ga-Radiopharmaceutical for PET Imaging of Prostate Cancer. *Pharmaceuticals* **2021**, *14* (8), 713.
- (29) Reubi, J.-C.; Laissue, J. A. Multiple Actions of Somatostatin in Neoplastic Disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **1995**, *16* (3), 110–115.
- (30) Flavell, R. R.; Naeger, D. M.; Mari Aparici, C.; Hawkins, R. A.; Pampaloni, M. H.; Behr, S. C. Malignancies with Low Fluorodeoxyglucose Uptake at PET/CT: Pitfalls and Prognostic Importance: Resident and Fellow Education Feature. *Radiographics* **2016**, *36* (1), 293–294.
- (31) Bianchini, G.; Iwamoto, T.; Qi, Y.; Coutant, C.; Shiang, C. Y.; Wang, B.; Santarpia, L.; Valero, V.; Hortobagyi, G. N.; Symmans, W. F.; Gianni, L.; Pusztai, L. Prognostic and Therapeutic Implications of Distinct Kinase Expression Patterns in Different Subtypes of Breast Cancer. *Cancer Res.* **2010**, *70* (21), 8852–8862.
- (32) Brandt, M.; Cardinale, J.; Aulsebrook, M. L.; Gasser, G.; Mindt, T. L. An Overview of PET Radiochemistry, Part 2: Radiometals. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59* (10), 1500–1506.
- (33) Kallur, K. G.; Ramachandra, P. G.; Rajkumar, K.; Swamy, S. S.; Desai, I.; Rao, R. M.; Patil, S. G.; Sridhar, P.; Madhusudhan, N.; Krishnappa, R. S.; Bhadrasetty, V.; Kumara, H. M.; Santhosh, S.; Ajaikumar, B. S. Clinical Utility of Gallium-68 PSMA PET/CT Scan for Prostate Cancer. *Indian J. Nucl. Med. IJNM Off. J. Soc. Nucl. Med. India* **2017**, *32* (2), 110–117.
- (34) Eder, M.; Neels, O.; Müller, M.; Bauder-Wüst, U.; Remde, Y.; Schäfer, M.; Hennrich, U.; Eisenhut, M.; Afshar-Oromieh, A.; Haberkorn, U.; Kopka, K. Novel Preclinical and

- Radiopharmaceutical Aspects of [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-HBED-CC: A New PET Tracer for Imaging of Prostate Cancer. *Pharmaceuticals* **2014**, 7 (7), 779–796.
- (35) Ametamey, S. M.; Honer, M.; Schubiger, P. A. Molecular Imaging with PET. *Chem. Rev.* **2008**, 108 (5), 1501–1516.
- (36) Nerella, S. G.; Singh, P.; Sanam, T.; Digwal, C. S. PET Molecular Imaging in Drug Development: The Imaging and Chemistry Perspective. *Front. Med.* **2022**, 9.
- (37) Deng, X.; Rong, J.; Wang, L.; Vasdev, N.; Zhang, L.; Josephson, L.; Liang, S. H. Chemistry for Positron Emission Tomography: Recent Advances in ¹¹C-, ¹⁸F-, ¹³N-, and ¹⁵O-Labeling Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, 58 (9), 2580–2605.
- (38) Petroni, D.; Berton, A.; Bettini, B.; Salvadori, P. Performances of a TRACERlab FX C Synthesis Module Using a Ni-Nanopowder/Molecular Sieves Mixed Catalyst. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2014**, 299, 2005–2014.
- (39) Långström, B.; Lundqvist, H. The Preparation of ¹¹C-Méthyl Iodide and Its Use in the Synthesis of ¹¹C-Méthyl-L-Methionine. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1976**, 27 (7), 357–363.
- (40) Larsen, P.; Ulin, J.; Dahlstrøm, K.; Jensen, M. Larsen P, Ulin J, Dahlstrøm K, Jensen M Synthesis of [¹¹C]Iodomethane by Iodination of [¹¹C]Methane. *Appl Radiat Isot* 48:153-157. *Appl. Radiat. Isot.* **1997**, 48, 153–157.
- (41) Link, J. M.; Krohn, K. A.; Clark, J. C. Production of [¹¹C]CH₃I by Single Pass Reaction of [¹¹C]CH₄ with I₂. *Nucl. Med. Biol.* **1997**, 24 (1), 93–97.
- (42) Någren, K.; Halldin, C. Méthylation of Amide and Thiol Functions with [¹¹C]Méthyl Triflate, as Exemplified by [¹¹C]NMSP, [¹¹C]Flumazenil and [¹¹C]Methionine. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1998**, 41 (9), 831–841.
- (43) Mock, B. H.; Mulholland, G. K.; Vavrek, M. T. Convenient Gas Phase Bromination of [¹¹C]Methane and Production of [¹¹C]Méthyl Triflate. *Nucl. Med. Biol.* **1999**, 26 (4), 467–471.
- (44) Jewett, D. M. A Simple Synthesis of [¹¹C]Méthyl Triflate. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. [A]* **1992**, 43 (11), 1383–1385.
- (45) Crouzel, C.; Comar, D. Carbon-11, Nitrogen-13 and Oxygen-15 — Labelled Molecules. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. B* **1986**, 13 (2), 119–126.
- (46) Philippe, C.; Haeusler, D.; Mitterhauser, M.; Ungersboeck, J.; Viernstein, H.; Dudczak, R.; Wadsak, W. Optimization of the Radiosynthesis of the Alzheimer Tracer 2-(4-N-[¹¹C]Méthylaminophenyl)-6-Hydroxybenzothiazole ([¹¹C]PIB). *Appl. Radiat. Isot.* **2011**, 69 (9), 1212–1217.

- (47) Hooker, J. M.; Reibel, A. T.; Hill, S. M.; Schueller, M. J.; Fowler, J. S. One-Pot, Direct Incorporation of [^{11}C]CO₂ into Carbamates. *Angew. Chem.* **2009**, *121* (19), 3534–3537.
- (48) Wilson, A. A.; Garcia, A.; Houle, S.; Vasdev, N. Direct Fixation of [^{11}C]-CO₂ by Amines: Formation of [^{11}C -Carbonyl]-Méthylcarbamates. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *8* (2), 428–432.
- (49) Schlosburg, J. E.; Kinsey, S. G.; Lichtman, A. H. Targeting Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) to Treat Pain and Inflammation. *AAPS J.* **2009**, *11* (1), 39–44.
- (50) Wilson, A. A.; Garcia, A.; Houle, S.; Sadowski, O.; Vasdev, N. Synthesis and Application of Isocyanates Radiolabeled with Carbon-11. *Chem. – Eur. J.* **2011**, *17* (1), 259–264.
- (51) Del Vecchio, A.; Caillé, F.; Chevalier, A.; Loreau, O.; Horkka, K.; Halldin, C.; Schou, M.; Camus, N.; Kessler, P.; Kuhnast, B.; Taran, F.; Audisio, D. Late-Stage Isotopic Carbon Labeling of Pharmaceutically Relevant Cyclic Ureas Directly from CO₂. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57* (31), 9744–9748.
- (52) Babin, V.; Sallustrau, A.; Loreau, O.; Caillé, F.; Goudet, A.; Cahuzac, H.; Vecchio, A. D.; Taran, F.; Audisio, D. A General Procedure for Carbon Isotope Labeling of Linear Urea Derivatives with Carbon Dioxide. *Chem. Commun.* **2021**, *57* (54), 6680–6683.
- (53) Del Vecchio, A.; Talbot, A.; Caillé, F.; Chevalier, A.; Sallustrau, A.; Loreau, O.; Destro, G.; Taran, F.; Audisio, D. Carbon Isotope Labeling of Carbamates by Late-Stage [^{11}C], [^{13}C] and [^{14}C]Carbon Dioxide Incorporation. *Chem. Commun.* **2020**, *56* (78), 11677–11680.
- (54) Mossine, A. V.; Brooks, A. F.; Jackson, I. M.; Quesada, C. A.; Sherman, P.; Cole, E. L.; Donnelly, D. J.; Scott, P. J. H.; Shao, X. Synthesis of Diverse ^{11}C -Labeled PET Radiotracers via Direct Incorporation of [^{11}C]CO₂. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27* (5), 1382–1389.
- (55) Peng, J.-B.; Geng, H.-Q.; Wu, X.-F. The Chemistry of CO: Carbonylation. *Chem* **2019**, *5* (3), 526–552.
- (56) Eriksson, J.; Antoni, G.; Långström, B.; Itsenko, O. The Development of ^{11}C -Carbonylation Chemistry: A Systematic View. *Nucl. Med. Biol.* **2021**, *92*, 115–137.
- (57) Taddei, C.; Pike, V. W. [^{11}C]Carbon Monoxide: Advances in Production and Application to PET Radiotracer Development over the Past 15 Years. *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **2019**, *4*, 25.
- (58) Taddei, C.; Bongarzone, S.; Gee, A. D. Instantaneous Conversion of [^{11}C]CO₂ to [^{11}C]CO via Fluoride-Activated Disilane Species. *Chem. – Eur. J.* **2017**, *23* (32), 7682–7685.

- (59) Taddei, C.; Bongarzone, S.; Dheere, A. K. H.; Gee, A. D. [^{11}C]CO₂ to [^{11}C]CO Conversion Mediated by [^{11}C]Silanes: A Novel Route for [^{11}C]Carbonylation Reactions. *Chem. Commun.* **2015**, 51 (59), 11795–11797.
- (60) Anders, D. A.; Bongarzone, S.; Fortt, R.; Gee, A. D.; Long, N. J. Electrochemical [^{11}C]CO₂ to [^{11}C]CO Conversion for PET Imaging. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **2017**, 53 (20), 2982–2985.
- (61) Dahl, K.; Ulin, J.; Schou, M.; Halldin, C. Reduction of [^{11}C]CO₂ to [^{11}C]CO Using Solid Supported Zinc. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2017**, 60 (13), 624–628.
- (62) Andersen, T. L.; Friis, S. D.; Audrain, H.; Nordeman, P.; Antoni, G.; Skrydstrup, T. Efficient ^{11}C -Carbonylation of Isolated Aryl Palladium Complexes for PET: Application to Challenging Radiopharmaceutical Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137 (4), 1548–1555.
- (63) Xu, Y.; Qu, W. [^{11}C]HCN Radiochemistry: Recent Progress and Future Perspectives. *Eur. J. Org. Chem.* **2021**, 2021 (33), 4653–4682.
- (64) Wu, X.; Chen, W.; Holmberg-Douglas, N.; Bida, G. T.; Tu, X.; Ma, X.; Wu, Z.; Nicewicz, D. A.; Li, Z. ^{11}C -, ^{12}C -, and ^{13}C -Cyanation of Electron-Rich Arenes via Organic Photoredox Catalysis. *Chem* **2023**, 9 (2), 343–362.
- (65) Chen, W.; Wu, X.; McManus, J. B.; Bida, G. T.; Li, K.-P.; Wu, Z.; Nicewicz, D. A.; Li, Z. Direct C–H Radiocyanation of Arenes via Organic Photoredox Catalysis. *Org. Lett.* **2022**, 24 (50), 9316–9321.
- (66) Lee, H. G.; Milner, P. J.; Placzek, M. S.; Buchwald, S. L.; Hooker, J. M. Virtually Instantaneous, Room-Temperature [^{11}C]-Cyanation Using Biaryl Phosphine Pd(0) Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137 (2), 648–651.
- (67) Nair, A. S.; Singh, A. K.; Kumar, A.; Kumar, S.; Sukumaran, S.; Koyiparambath, V. P.; Pappachen, L. K.; Rangarajan, T. M.; Kim, H.; Mathew, B. FDA-Approved Trifluorométhyl Group-Containing Drugs: A Review of 20 Years. *Processes* **2022**, 10 (10), 2054.
- (68) Haskali, M. B.; Pike, V. W. [^{11}C]Fluoroform, a Breakthrough for Versatile Labeling of PET Radiotracer Trifluorométhyl Groups in High Molar Activity. *Chem. – Eur. J.* **2017**, 23 (34), 8156–8160.
- (69) Inoue, M.; Sumii, Y.; Shibata, N. Contribution of Organofluorine Compounds to Pharmaceuticals. *ACS Omega* **2020**, 5 (19), 10633–10640.
- (70) Richter, S.; Wuest, F. ^{18}F -Labeled Peptides: The Future Is Bright. *Molecules* **2014**, 19 (12), 20536–20556.

- (71) Jacobson, O.; Kiesewetter, D. O.; Chen, X. Fluorine-18 Radiochemistry, Labeling Strategies and Synthetic Routes. *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26* (1), 1–18.
- (72) Ido, T.; Wan, C.-N.; Casella, V.; Fowler, J. S.; Wolf, A. P.; Reivich, M.; Kuhl, D. E. 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. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1978**, *14* (2), 175–183.
- (73) Coenen, H. H.; Ermert, J. ¹⁸F-Labeling Innovations and Their Potential for Clinical Application. *Clin. Transl. Imaging* **2018**, *6* (3), 169–193.
- (74) Namavari, M.; Bishop, A.; Satyamurthy, N.; Bida, G.; Barrio, J. R. Regioselective Radiofluorodestannylation with [¹⁸F]F₂ and [¹⁸F]CH₃COOF: A High Yield Synthesis of 6-[¹⁸F]Fluoro-1-Dopa. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. [A]* **1992**, *43* (8), 989–996.
- (75) Krzyczmonik, A.; Keller, T.; López-Picón, F. R.; Forsback, S.; Kirjavainen, A. K.; Takkinen, J. S.; Wasilewska, A.; Scheinin, M.; Haaparanta-Solin, M.; Sączewski, F.; Solin, O. Radiosynthesis and Preclinical Evaluation of an α 2A-Adrenoceptor Tracer Candidate, 6-[¹⁸F]Fluoro-Marsanidine. *Mol. Imaging Biol.* **2019**, *21* (5), 879–887.
- (76) Langstrom, B.; Ulin, J. Production of [¹⁸F]-F₂ from [¹⁸F]-Fluoride Using a Plasma Induced Scrambling Procedure. *US8492671B2*, July 23, 2013.
- (77) Khandelwal, M.; Pemawat, G.; Kanwar Khangarot, R. Recent Developments in Nucleophilic Fluorination with Potassium Fluoride (KF): A Review. *Asian J. Org. Chem.* **2022**, *11* (9).
- (78) Jana, S.; Al-huniti, M. H.; Yang, B. Y.; Lu, S.; Pike, V. W.; Lepore, S. D. Crown Ether Nucleophilic Catalysts (CENCs): Agents for Enhanced Silicon Radiofluorination. *J. Org. Chem.* **2017**, *82* (5), 2329–2335.
- (79) Block, D.; Klätte, B.; Knöchel, A.; Beckmann, R.; Holm, U. N.C.A. [¹⁸F]-Labeling of Aliphatic Compounds in High Yields via Aminopolyether - Supported Nucleophilic Substitution. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1986**, *23* (5), 467–477.
- (80) Leibler, I. N.-M.; Gandhi, S. S.; Tekle-Smith, M. A.; Doyle, A. G. Strategies for Nucleophilic C(Sp³)-(Radio)Fluorination. *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145* (18), 9928–9950.
- (81) Jacobson, O.; Chen, X. PET Designated Fluoride-18 Production and Chemistry. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10* (11), 1048–1059.
- (82) Coenen, H. H. Fluorine-18 Labeling Methods: Features and Possibilities of Basic Reactions. *Ernst Scher. Res. Found. Workshop* **2007**, No. 62, 15–50.

- (83) Zhang, M.-R.; Suzuki, K. [¹⁸F]Fluoroalkyl Agents: Synthesis, Reactivity and Application for Development of PET Ligands in Molecular Imaging. *Curr. Top. Med. Chem.* **7** (18), 1817–1828.
- (84) Damont, A.; Hinnen, F.; Kuhnast, B.; Schöllhorn-Peyronneau, M.-A.; James, M.; Luus, C.; Tavitian, B.; Kassiou, M.; Dollé, F. Radiosynthesis of [¹⁸F]DPA-714, a Selective Radioligand for Imaging the Translocator Protein (18 kDa) with PET. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2008**, *51* (7), 286–292.
- (85) Selivanova, S. V.; Mu, L.; Ungersboeck, J.; Stellfeld, T.; Ametamey, S. M.; Schibli, R.; Wadsak, W. Single-Step Radiofluorination of Peptides Using Continuous Flow Microreactor. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (19), 3871–3874.
- (86) Becaud, J.; Mu, L.; Karamkam, M.; Schubiger, P. A.; Ametamey, S. M.; Graham, K.; Stellfeld, T.; Lehmann, L.; Borkowski, S.; Berndorff, D.; Dinkelborg, L.; Srinivasan, A.; Smits, R.; Koksche, B. Direct One-Step ¹⁸F-Labeling of Peptides via Nucleophilic Aromatic Substitution. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20* (12), 2254–2261.
- (87) Pérez, D. J.; Amirhossein Tabatabaei Dakhili, S.; Bergman, C.; Dufour, J.; Wuest, M.; Juengling, F. D.; Wuest, F.; Velázquez-Martínez, C. A. FOXM1 Inhibitors as Potential Diagnostic Agents: First Generation of a PET Probe Targeting FOXM1 To Detect Triple-Negative Breast Cancer in Vitro and in Vivo. *ChemMedChem* **2021**, *16* (24), 3720–3729.
- (88) Dolci, L.; Dolle, F.; Jubeau, S.; Vaufrey, F.; Crouzel, C. 2-[¹⁸F]Fluoropyridines by No-Carrier-Added Nucleophilic Aromatic Substitution with [¹⁸F]FK-K222—a Comparative Study. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1999**, *42* (10), 975–985.
- (89) Lee, Y.-S.; Chun, J.-H.; Hodošček, M.; Pike, V. W. Crystal Structures of Diaryliodonium Fluorides and Their Implications for Fluorination Mechanisms. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* **2017**, *23* (18), 4353–4363.
- (90) Pike, V. W.; Aigbirhio, F. I. Reactions of Cyclotron-Produced [¹⁸F]Fluoride with Diaryliodonium Salts—a Novel Single-Step Route to No-Carrier-Added [¹⁸F]Fluoroarenes. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, No. 21, 2215–2216.
- (91) Chen, W.; Silverman, D. H. S.; Delaloye, S.; Czernin, J.; Kamdar, N.; Pope, W.; Satyamurthy, N.; Schiepers, C.; Cloughesy, T. ¹⁸F-FDOPA PET Imaging of Brain Tumors: Comparison Study with ¹⁸F-FDG PET and Evaluation of Diagnostic Accuracy. *J. Nucl. Med.* **2006**, *47* (6), 904–911.
- (92) Maisonia-Besset, A.; Serre, A.; Ouadi, A.; Schmitt, S.; Canitrot, D.; Léal, F.; Miot-Noirault, E.; Brasse, D.; Marchand, P.; Chezal, J.-M. Base/Cryptand/Metal-Free Automated Nucleophilic Radiofluorination of [¹⁸F]FDOPA from Iodonium Salts:

- Importance of Hydrogen Carbonate Counterion. *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 2018 (48), 7058–7065.
- (93) Cardinale, J.; Ermert, J.; Humpert, S.; Coenen, H. H. Iodonium Ylides for One-Step, No-Carrier-Added Radiofluorination of Electron Rich Arenes, Exemplified with 4-((¹⁸F)Fluorophenoxy)-Phenylméthyl)Piperidine NET and SERT Ligands. *RSC Adv.* **2014**, 4 (33), 17293–17299.
- (94) Neumann, C. N.; Hooker, J. M.; Ritter, T. Concerted Nucleophilic Aromatic Substitution with ¹⁹F⁻ and ¹⁸F⁻. *Nature* **2016**, 534 (7607), 369–373.
- (95) Beyzavi, H.; Mandal, D.; Strebl, M. G.; Neumann, C. N.; D'Amato, E. M.; Chen, J.; Hooker, J. M.; Ritter, T. ¹⁸F-Deoxyfluorination of Phenols via Ru π -Complexes. *ACS Cent. Sci.* **2017**, 3 (9), 944–948.
- (96) Lee, E.; Kamlet, A. S.; Powers, D. C.; Neumann, C. N.; Boursalian, G. B.; Furuya, T.; Choi, D. C.; Hooker, J. M.; Ritter, T. A Fluoride-Derived Electrophilic Late-Stage Fluorination Reagent for PET Imaging. *Science* **2011**, 334 (6056), 639–642.
- (97) Lee, E.; Hooker, J. M.; Ritter, T. Nickel-Mediated Oxidative Fluorination for PET with Aqueous [¹⁸F] Fluoride. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134 (42), 17456–17458.
- (98) Tredwell, M.; Preshlock, S. M.; Taylor, N. J.; Gruber, S.; Huiban, M.; Passchier, J.; Mercier, J.; Génicot, C.; Gouverneur, V. A General Copper-Mediated Nucleophilic ¹⁸F Fluorination of Arenes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53 (30), 7751–7755.
- (99) West, M. J.; Fyfe, J. W. B.; Vantourout, J. C.; Watson, A. J. B. Mechanistic Development and Recent Applications of the Chan–Lam Amination. *Chem. Rev.* **2019**, 119 (24), 12491–12523.
- (100) Taylor, N. J.; Emer, E.; Preshlock, S.; Schedler, M.; Tredwell, M.; Verhoog, S.; Mercier, J.; Génicot, C.; Gouverneur, V. Derisking the Cu-Mediated ¹⁸F-Fluorination of Heterocyclic Positron Emission Tomography Radioligands. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139 (24), 8267–8276.
- (101) Mossine, A. V.; Tanzey, S. S.; Brooks, A. F.; Makaravage, K. J.; Ichiishi, N.; Miller, J. M.; Henderson, B. D.; Erhard, T.; Bruetting, C.; Skaddan, M. B.; Sanford, M. S.; Scott, P. J. H. Synthesis of High-Molar-Activity [¹⁸F]6-Fluoro-L-DOPA Suitable for Human Use via Cu-Mediated Fluorination of a BPin Precursor. *Nat. Protoc.* **2020**, 15 (5), 1742–1759.
- (102) Ye, Y.; Sanford, M. S. Mild Copper-Mediated Fluorination of Aryl Stannanes and Aryl Trifluoroborates. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135 (12), 4648–4651.

- (103) Mossine, A. V.; Tanzey, S. S.; Brooks, A. F.; Makaravage, K. J.; Ichiishi, N.; Miller, J. M.; Henderson, B. D.; Skaddan, M. B.; Sanford, M. S.; Scott, P. J. H. One-Pot Synthesis of High Molar Activity 6-^[18F]Fluoro-L-DOPA by Cu-Mediated Fluorination of a BPin Precursor. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17* (38), 8701–8705.
- (104) Madka, V.; Zhang, Y.; Li, Q.; Mohammed, A.; Sindhwani, P.; Lightfoot, S.; Wu, X.-R.; Kopelovich, L.; Rao, C. V. P53-Stabilizing Agent CP-31398 Prevents Growth and Invasion of Urothelial Cancer of the Bladder in Transgenic UPII-SV40T Mice. *Neoplasia N. Y. N* **2013**, *15* (8), 966–974.
- (105) Li, B.; Li, Y.; Tomkiewicz-Raulet, C.; Dao, P.; Lietha, D.; Yen-Pon, E.; Du, Z.; Coumoul, X.; Garbay, C.; Etheve-Quellejeu, M.; Chen, H. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Covalent Inhibitors of Focal Adhesion Kinase (FAK) against Human Malignant Glioblastoma. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (21), 12707–12724.
- (106) Schnute, M. E.; McReynolds, M. D.; Kasten, T.; Yates, M.; Jerome, G.; Rains, J. W.; Hall, T.; Chrencik, J.; Kraus, M.; Cronin, C. N.; Saabye, M.; Highkin, M. K.; Broadus, R.; Ogawa, S.; Cukyne, K.; Zawadzke, L. E.; Peterkin, V.; Iyanar, K.; Scholten, J. A.; Wendling, J.; Fujiwara, H.; Nemirovskiy, O.; Wittwer, A. J.; Nagiec, M. M. Modulation of Cellular S1P Levels with a Novel, Potent and Specific Inhibitor of Sphingosine Kinase-1. *Biochem. J.* **2012**, *444* (1), 79–88.
- (107) Ju, T.; Gao, D.; Fang, Z. Targeting Colorectal Cancer Cells by a Novel Sphingosine Kinase 1 Inhibitor PF-543. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *470* (3), 728–734.
- (108) Kim, S. W.; Lee, T.; Oh, Y. S.; Shin, S. M.; Lee, J.-Y.; Kim, S.; Baek, D. J.; Park, E.-Y. Synthesis and Biological Evaluation of PF-543 Derivative Containing Aliphatic Side Chain. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2019**, *67* (6), 599–603.
- (109) Toledo, F.; Bluteau, O.; Simeonova, I. The activation of p53 in tumors: a promising strategy against cancer. *Med. Sci. MS* **2007**, *23* (6–7), 565–567.
- (110) Benchimol, S. P53-Dependent Pathways of Apoptosis. *Cell Death Differ.* **2001**, *8* (11), 1049–1051.
- (111) Toledo, F.; Wahl, G. M. Regulating the P53 Pathway: In Vitro Hypotheses, in Vivo Veritas. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6* (12), 909–923.
- (112) Levine, A. J. P53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell* **1997**, *88* (3), 323–331.
- (113) Meek, D. W. Tumour Suppression by P53: A Role for the DNA Damage Response? *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9* (10), 714–723.

- (114) Bieging, K. T.; Mello, S. S.; Attardi, L. D. Unravelling Mechanisms of P53-Mediated Tumour Suppression. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14* (5), 359–370.
- (115) Hainaut, P. TP53 tumor suppressor gene: 20 years (and ten thousand mutations) later. *Bull. Cancer (Paris)* **2000**, *87* (1), 11–18.
- (116) Vousden, K. H.; Lu, X. Live or Let Die: The Cell's Response to P53. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2* (8), 594–604.
- (117) Vousden, K. H. Outcomes of P53 Activation - Spoilt for Choice. *J. Cell Sci.* **2006**, *119* (24), 5015–5020.
- (118) Honda, R.; Tanaka, H.; Yasuda, H. Oncoprotein MDM2 Is a Ubiquitin Ligase E3 for Tumor Suppressor P53. *FEBS Lett.* **1997**, *420* (1), 25–27.
- (119) Kamada, R.; Toguchi, Y.; Nomura, T.; Imagawa, T.; Sakaguchi, K. Tetramer Formation of Tumor Suppressor Protein P53: Structure, Function, and Applications. *Pept. Sci.* **2016**, *106* (4), 598–612.
- (120) Lane, D. P. P53, Guardian of the Genome. *Nature* **1992**, *358* (6381), 15–16.
- (121) Hollstein, M.; Rice, K.; Greenblatt, M. S.; Soussi, T.; Fuchs, R.; Sørli, T.; Hovig, E.; Smith-Sørensen, B.; Montesano, R.; Harris, C. C. Database of P53 Gene Somatic Mutations in Human Tumors and Cell Lines. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22* (17), 3551–3555.
- (122) Vogelstein, B.; Lane, D.; Levine, A. J. Surfing the P53 Network. *Nature* **2000**, *408* (6810), 307–310.
- (123) Sjöblom, T.; Jones, S.; Wood, L. D.; Parsons, D. W.; Lin, J.; Barber, T. D.; Mandelker, D.; Leary, R. J.; Ptak, J.; Silliman, N.; Szabo, S.; Buckhaults, P.; Farrell, C.; Meeh, P.; Markowitz, S. D.; Willis, J.; Dawson, D.; Willson, J. K. V.; Gazdar, A. F.; Hartigan, J.; Wu, L.; Liu, C.; Parmigiani, G.; Park, B. H.; Bachman, K. E.; Papadopoulos, N.; Vogelstein, B.; Kinzler, K. W.; Velculescu, V. E. The Consensus Coding Sequences of Human Breast and Colorectal Cancers. *Science* **2006**, *314* (5797), 268–274.
- (124) Bullock, A. N.; Fersht, A. R. Rescuing the Function of Mutant P53. *Nat. Rev. Cancer* **2001**, *1* (1), 68–76.
- (125) Selivanova, G. Therapeutic Targeting of P53 by Small Molecules. *Semin. Cancer Biol.* **2010**, *20* (1), 46–56.
- (126) Kim, A. L.; Athar, M.; Bickers, D. R.; Gautier, J. Stage-Specific Alterations of Cyclin Expression during UVB-Induced Murine Skin Tumor Development. *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75* (1), 58–67.

- (127) Abdel-Fatah, T. M.; Powe, D. G.; Agboola, J.; Adamowicz-Brice, M.; Blamey, R. W.; Lopez-Garcia, M. A.; Green, A. R.; Reis-Filho, J. S.; Ellis, I. O. The Biological, Clinical and Prognostic Implications of P53 Transcriptional Pathways in Breast Cancers. *J. Pathol.* **2010**, *220* (4), 419–434.
- (128) Deb, S. P.; Muñoz, R. M.; Brown, D. R.; Subler, M. A.; Deb, S. Wild-Type Human P53 Activates the Human Epidermal Growth Factor Receptor Promoter. *Oncogene* **1994**, *9* (5), 1341–1349.
- (129) Dittmer, D.; Pati, S.; Zambetti, G.; Chu, S.; Teresky, A. K.; Moore, M.; Finlay, C.; Levine, A. J. Gain of Function Mutations in P53. *Nat. Genet.* **1993**, *4* (1), 42–46.
- (130) Blandino, G.; Levine, A. J.; Oren, M. Mutant P53 Gain of Function: Differential Effects of Different P53 Mutants on Resistance of Cultured Cells to Chemotherapy. *Oncogene* **1999**, *18* (2), 477–485.
- (131) Attardi, L. D.; Jacks, T. The Role of P53 in Tumour Suppression: Lessons from Mouse Models. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **1999**, *55* (1), 48–63.
- (132) Muller, P. A. J.; Caswell, P. T.; Doyle, B.; Iwanicki, M. P.; Tan, E. H.; Karim, S.; Lukashchuk, N.; Gillespie, D. A.; Ludwig, R. L.; Gosselin, P.; Cromer, A.; Brugge, J. S.; Sansom, O. J.; Norman, J. C.; Vousden, K. H. Mutant P53 Drives Invasion by Promoting Integrin Recycling. *Cell* **2009**, *139* (7), 1327–1341.
- (133) Prescott, J. L.; Montie, J.; Pugh, T. W.; McHugh, T.; Veltri, R. W. Clinical Sensitivity of P53 Mutation Detection in Matched Bladder Tumor, Bladder Wash, and Voided Urine Specimens. *Cancer* **2001**, *91* (11), 2127–2135.
- (134) Segers, K.; Singh, S. K.; Ramael, M.; Van Marck, E.; Backhovens, H.; De Voecht, J.; Van Broeckhoven, C. Immunoreactivity for P53 and Mdm2 and the Detection of P53 Mutations in Human Malignant Mesothelioma. *Virchows Arch.* **1995**, *427* (4), 431–436.
- (135) García-Cao, I.; García-Cao, M.; Martín-Caballero, J.; Criado, L. M.; Klatt, P.; Flores, J. M.; Weill, J.-C.; Blasco, M. A.; Serrano, M. “Super P53” Mice Exhibit Enhanced DNA Damage Response, Are Tumor Resistant and Age Normally. *EMBO J.* **2002**, *21* (22), 6225–6235.
- (136) Vassilev, L. T. MDM2 Inhibitors for Cancer Therapy. *Trends Mol. Med.* **2007**, *13* (1), 23–31.
- (137) Cheok, C. F.; Verma, C. S.; Baselga, J.; Lane, D. P. Translating P53 into the Clinic. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2011**, *8* (1), 25–37.
- (138) Bykov, V. J. N.; Issaeva, N.; Selivanova, G.; Wiman, K. G. Mutant P53-Dependent Growth Suppression Distinguishes PRIMA-1 from Known Anticancer Drugs: A

- Statistical Analysis of Information in the National Cancer Institute Database. *Carcinogenesis* **2002**, 23 (12), 2011–2018.
- (139) Wang, W.; Takimoto, R.; Rastinejad, F.; El-Deiry, W. S. Stabilization of P53 by CP-31398 Inhibits Ubiquitination without Altering Phosphorylation at Serine 15 or 20 or MDM2 Binding. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, 23 (6), 2171–2181.
- (140) Lambert, J. M. R.; Moshfegh, A.; Hainaut, P.; Wiman, K. G.; Bykov, V. J. N. Mutant P53 Reactivation by PRIMA-1MET Induces Multiple Signaling Pathways Converging on Apoptosis. *Oncogene* **2010**, 29 (9), 1329–1338.
- (141) Lewis, E. J. PRIMA-1 as a Cancer Therapy Restoring Mutant P53: A Review. *Biosci. Horiz. Int. J. Stud. Res.* **2015**, 8, hzv006.
- (142) Ali, D.; Jönsson-Videsäter, K.; Deneberg, S.; Bengtzén, S.; Nahi, H.; Paul, C.; Lehmann, S. APR-246 Exhibits Anti-Leukemic Activity and Synergism with Conventional Chemotherapeutic Drugs in Acute Myeloid Leukemia Cells. *Eur. J. Haematol.* **2011**, 86 (3), 206–215.
- (143) Bykov, V. J. N.; Issaeva, N.; Shilov, A.; Hultcrantz, M.; Pugacheva, E.; Chumakov, P.; Bergman, J.; Wiman, K. G.; Selivanova, G. Restoration of the Tumor Suppressor Function to Mutant P53 by a Low-Molecular-Weight Compound. *Nat. Med.* **2002**, 8 (3), 282–288.
- (144) Lehmann, S.; Bykov, V. J. N.; Ali, D.; Andrén, O.; Cherif, H.; Tidefelt, U.; Uggla, B.; Yachnin, J.; Juliusson, G.; Moshfegh, A.; Paul, C.; Wiman, K. G.; Andersson, P.-O. Targeting P53 in Vivo: A First-in-Human Study with P53-Targeting Compound APR-246 in Refractory Hematologic Malignancies and Prostate Cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2012**, 30 (29), 3633–3639.
- (145) Tang, X.; Zhu, Y.; Han, L.; Kim, A. L.; Kopelovich, L.; Bickers, D. R.; Athar, M. CP-31398 Restores Mutant P53 Tumor Suppressor Function and Inhibits UVB-Induced Skin Carcinogenesis in Mice. *J. Clin. Invest.* **2007**, 117 (12), 3753–3764.
- (146) Qian, R.; Cao, Y.; Long, Y.-T. Dual-Targeting Nanovesicles for In Situ Intracellular Imaging of and Discrimination between Wild-Type and Mutant P53. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55 (2), 719–723.
- (147) Liu, Z.; Miao, Z.; Li, J.; Fang, K.; Zhuang, C.; Du, L.; Sheng, C.; Li, M. A Fluorescent Probe for Imaging P53–MDM2 Protein–Protein Interaction. *Chem. Biol. Drug Des.* **2015**, 85 (4), 411–417.

- (148) Hamstra, D. A.; Bhojani, M. S.; Griffin, L. B.; Laxman, B.; Ross, B. D.; Rehemtulla, A. Real-Time Evaluation of P53 Oscillatory Behavior In Vivo Using Bioluminescent Imaging. *Cancer Res.* **2006**, *66* (15), 7482–7489.
- (149) Zhou, Z.-R.; Li, D.-W.; Qian, R.-C.; Ju, H. DNAzyme-Powered DNA Walker for Cooperative Expression Imaging of Mutant P53 and Telomerase in Cancer Cells. *Anal. Chem.* **2023**, *95* (8), 4122–4130.
- (150) Doubrovin, M.; Ponomarev, V.; Beresten, T.; Balatoni, J.; Bornmann, W.; Finn, R.; Humm, J.; Larson, S.; Sadelain, M.; Blasberg, R.; Gelovani Tjuvajev, J. Imaging Transcriptional Regulation of P53-Dependent Genes with Positron Emission Tomography in Vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98* (16), 9300–9305.
- (151) Nerella, S. G.; Singh, P.; Sanam, T.; Digwal, C. S. PET Molecular Imaging in Drug Development: The Imaging and Chemistry Perspective. *Front. Med.* **2022**, *9*, 812270.
- (152) Takimoto, R.; Wang, W.; Dicker, D. T.; Rastinejad, F.; Lyssikatos, J.; El-Deiry, W. S. The Mutant P53-Conformation Modifying Drug, CP-31398, Can Induce Apoptosis. *Cancer Biol. Ther.* **2002**, *1* (1), 47–55.
- (153) Foster, B. A.; Coffey, H. A.; Morin, M. J.; Rastinejad, F. Pharmacological Rescue of Mutant P53 Conformation and Function. *Science* **1999**, *286* (5449), 2507–2510.
- (154) Johnson, W. D.; Muzzio, M.; Detrisac, C. J.; Kapetanovic, I. M.; Kopelovich, L.; McCormick, D. L. Subchronic Oral Toxicity and Metabolite Profiling of the P53 Stabilizing Agent, CP-31398, in Rats and Dogs. *Toxicology* **2011**, *289* (2), 141–150.
- (155) Zhang, W.; Oya, S.; Kung, M.-P.; Hou, C.; Maier, D. L.; Kung, H. F. F-18 Polyethyleneglycol Stilbenes as PET Imaging Agents Targeting A β Aggregates in the Brain. *Nucl. Med. Biol.* **2005**, *32* (8), 799–809.
- (156) Liu, Y.; Zhu, L.; Plössl, K.; Choi, S. R.; Qiao, H.; Sun, X.; Li, S.; Zha, Z.; Kung, H. F. Optimization of Automated Radiosynthesis of [^{18}F]AV-45: A New PET Imaging Agent for Alzheimer's Disease. *Nucl. Med. Biol.* **2010**, *37* (8), 917–925.
- (157) Zhang, X.; Wang, H.; Ma, Z.; Wu, B. Effects of Pharmaceutical PEGylation on Drug Metabolism and Its Clinical Concerns. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2014**, *10* (12), 1691–1702.
- (158) Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; Schubert, U. S. Poly(Ethylene Glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2010**, *49* (36), 6288–6308.

- (159) Mularski, J.; Malarz, K.; Pacholczyk, M.; Musiol, R. The P53 Stabilizing Agent CP-31398 and Multi-Kinase Inhibitors. Designing, Synthesizing and Screening of Styrylquinazoline Series. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *163*, 610–625.
- (160) Sutherland, H. S.; Hwang, I. Y.; Marshall, E. S.; Lindsay, B. S.; Denny, W. A.; Gilchrist, C.; Joseph, W. R.; Greenhalgh, D.; Richardson, E.; Kestell, P.; Ding, A.; Baguley, B. C. Therapeutic Reactivation of Mutant P53 Protein by Quinazoline Derivatives. *Invest. New Drugs* **2012**, *30* (5), 2035–2045.
- (161) Wan, Z.-K.; Wacharasindhu, S.; Binnun, E.; Mansour, T. An Efficient Direct Amination of Cyclic Amides and Cyclic Ureas. *Org. Lett.* **2006**, *8* (11), 2425–2428.
- (162) Newman, M. S.; Sankaran, V.; Olson, D. R. Phenolic and Ketonic Tautomers in Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98* (11), 3237–3242.
- (163) Bartholomä, M. D.; Gottumukkala, V.; Zhang, S.; Baker, A.; Dunning, P.; Fahey, F. H.; Treves, S. T.; Packard, A. B. Effect of the Prosthetic Group on the Pharmacologic Properties of ¹⁸F-Labeled Rhodamine B, a Potential Myocardial Perfusion Agent for Positron Emission Tomography (PET). *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (24), 11004–11012.
- (164) Che, T.; Chen, S.-B.; Tu, J.-L.; Wang, B.; Wang, Y.-Q.; Zhang, Y.; Wang, J.; Wang, Z.-Q.; Zhang, Z.-P.; Ou, T.-M.; Zhao, Y.; Tan, J.-H.; Huang, Z.-S. Discovery of Novel Schizocommunin Derivatives as Telomeric G-Quadruplex Ligands That Trigger Telomere Dysfunction and the Deoxyribonucleic Acid (DNA) Damage Response. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (8), 3436–3453.
- (165) Okano, M.; Mito, J.; Maruyama, Y.; Masuda, H.; Niwa, T.; Nakagawa, S.; Nakamura, Y.; Matsuura, A. Discovery and Structure–Activity Relationships of 4-Aminoquinazoline Derivatives, a Novel Class of Opioid Receptor like-1 (ORL1) Antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17* (1), 119–132.
- (166) Makaravage, K. J.; Brooks, A. F.; Mossine, A. V.; Sanford, M. S.; Scott, P. J. H. Copper-Mediated Radiofluorination of Arylstannanes with [¹⁸F]KF. *Org. Lett.* **2016**, *18* (20), 5440–5443.
- (167) Chao, M. N.; Chezal, J.-M.; Debiton, E.; Canitrot, D.; Witkowski, T.; Levesque, S.; Degoul, F.; Tarrit, S.; Wenzel, B.; Miot-Noirault, E.; Serre, A.; Maisonia-Besset, A. A Convenient Route to New (Radio)Fluorinated and (Radio)Iodinated Cyclic Tyrosine Analogs. *Pharmaceuticals* **2022**, *15* (2), 162.
- (168) Andersen, I. V.; García-Vázquez, R.; Battisti, U. M.; Herth, M. M. Optimization of Direct Aromatic ¹⁸F-Labeling of Tetrazines. *Molecules* **2022**, *27* (13), 4022.

- (169) Hoffmann, C.; Kolks, N.; Smets, D.; Haseloer, A.; Gröner, B.; Urusova, E. A.; Endepols, H.; Neumaier, F.; Ruschewitz, U.; Klein, A.; Neumaier, B.; Zlatopolskiy, B. D. Next Generation Copper Mediators for the Efficient Production of ^{18}F -Labeled Aromatics. *Chem. – Eur. J.* **2023**, *29* (2).
- (170) Rao, C. V.; Swamy, M. V.; Patlolla, J. M. R.; Kopelovich, L. Suppression of Familial Adenomatous Polyposis by CP-31398, a TP53 Modulator, in *APCmin/+* Mice. *Cancer Res.* **2008**, *68* (18), 7670–7675.
- (171) Demma, M. J.; Wong, S.; Maxwell, E.; Dasmahapatra, B. CP-31398 Restores DNA-Binding Activity to Mutant P53 in Vitro but Does Not Affect P53 Homologs P63 and P73 *. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (44), 45887–45896.
- (172) Rippin, T. M.; Bykov, V. J. N.; Freund, S. M. V.; Selivanova, G.; Wiman, K. G.; Fersht, A. R. Characterization of the P53-Rescue Drug CP-31398 in Vitro and in Living Cells. *Oncogene* **2002**, *21* (14), 2119–2129.
- (173) Hanks, S. K.; Calalb, M. B.; Harper, M. C.; Patel, S. K. Focal Adhesion Protein-Tyrosine Kinase Phosphorylated in Response to Cell Attachment to Fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89* (18), 8487–8491.
- (174) Avraham, S.; London, R.; Fu, Y.; Ota, S.; Hiregowdara, D.; Li, J.; Jiang, S.; Pasztor, L. M.; White, R. A.; Groopman, J. E.; Avraham, H. Identification and Characterization of a Novel Related Adhesion Focal Tyrosine Kinase (RAFTK) from Megakaryocytes and Brain (*). *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (46), 27742–27751.
- (175) Chen, H.-C.; Appeddu, P. A.; Parsons, J. T.; Hildebrand, J. D.; Schaller, M. D.; Guan, J.-L. Interaction of Focal Adhesion Kinase with Cytoskeletal Protein Talin (*). *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (28), 16995–16999.
- (176) Schaller, M. D. Biochemical Signals and Biological Responses Elicited by the Focal Adhesion Kinase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2001**, *1540* (1), 1–21.
- (177) Lietha, D.; Cai, X.; Ceccarelli, D. F. J.; Li, Y.; Schaller, M. D.; Eck, M. J. Structural Basis for the Autoinhibition of Focal Adhesion Kinase. *Cell* **2007**, *129* (6), 1177–1187.
- (178) Sieg, D. J.; Hauck, C. R.; Ilic, D.; Klingbeil, C. K.; Schaefer, E.; Damsky, C. H.; Schlaepfer, D. D. FAK Integrates Growth-Factor and Integrin Signals to Promote Cell Migration. *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2* (5), 249–256.
- (179) Parsons, J. T. Focal Adhesion Kinase: The First Ten Years. *J. Cell Sci.* **2003**, *116* (Pt 8), 1409–1416.

- (180) Schaller, M. D.; Hildebrand, J. D.; Shannon, J. D.; Fox, J. W.; Vines, R. R.; Parsons, J. T. Autophosphorylation of the Focal Adhesion Kinase, pp125FAK, Directs SH2-Dependent Binding of Pp60src. *Mol. Cell. Biol.* **1994**, *14* (3), 1680–1688.
- (181) Frame, M. C.; Patel, H.; Serrels, B.; Lietha, D.; Eck, M. J. The FERM Domain: Organizing the Structure and Function of FAK. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11* (11), 802–814.
- (182) Parsons, J. T.; Martin, K. H.; Slack, J. K.; Taylor, J. M.; Weed, S. A. Focal Adhesion Kinase: A Regulator of Focal Adhesion Dynamics and Cell Movement. *Oncogene* **2000**, *19* (49), 5606–5613.
- (183) Lee, B. Y.; Timpson, P.; Horvath, L. G.; Daly, R. J. FAK Signaling in Human Cancer as a Target for Therapeutics. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *146*, 132–149.
- (184) Maung, K.; Easty, D. J.; Hill, S. P.; Bennett, D. C. Requirement for Focal Adhesion Kinase in Tumor Cell Adhesion. *Oncogene* **1999**, *18* (48), 6824–6828.
- (185) Braren, R.; Hu, H.; Kim, Y. H.; Beggs, H. E.; Reichardt, L. F.; Wang, R. Endothelial FAK Is Essential for Vascular Network Stability, Cell Survival, and Lamellipodial Formation. *J. Cell Biol.* **2006**, *172* (1), 151–162.
- (186) Forrest, A. D.; Beggs, H. E.; Reichardt, L. F.; Dupree, J. L.; Colello, R. J.; Fuss, B. Focal Adhesion Kinase (FAK): A Regulator of CNS Myelination. *J. Neurosci. Res.* **2009**, *87* (15), 3456–3464.
- (187) Zaghdoudi, S.; Decaup, E.; Belhabib, I.; Samain, R.; Cassant-Sourdy, S.; Rochotte, J.; Brunel, A.; Schlaepfer, D.; Cros, J.; Neuzillet, C.; Strehaiano, M.; Alard, A.; Tomasini, R.; Rajeeve, V.; Perraud, A.; Mathonnet, M.; Pearce, O. M.; Martineau, Y.; Pyronnet, S.; Bousquet, C.; Jean, C. FAK Activity in Cancer-associated Fibroblasts Is a Prognostic Marker and a Druggable Key Metastatic Player in Pancreatic Cancer. *EMBO Mol. Med.* **2020**, *12* (11).
- (188) Jones, R. J.; Brunton, V. G.; Frame, M. C. Adhesion-Linked Kinases in Cancer; Emphasis on Src, Focal Adhesion Kinase and PI 3-Kinase. *Eur. J. Cancer* **2000**, *36* (13), 1595–1606.
- (189) Lark, A. L.; Livasy, C. A.; Dressler, L.; Moore, D. T.; Millikan, R. C.; Geradts, J.; Iacocca, M.; Cowan, D.; Little, D.; Craven, R. J.; Cance, W. High Focal Adhesion Kinase Expression in Invasive Breast Carcinomas Is Associated with an Aggressive Phenotype. *Mod. Pathol.* **2005**, *18* (10), 1289–1294.
- (190) Kim, S. J.; Park, J. W.; Yoon, J. S.; Mok, J. O.; Kim, Y. J.; Park, H. K.; Kim, C. H.; Byun, D. W.; Lee, Y. J.; Jin, S. Y.; Suh, K. I.; Yoo, M. H. Increased Expression of Focal

- Adhesion Kinase in Thyroid Cancer: Immunohistochemical Study. *J. Korean Med. Sci.* **2004**, *19* (5), 710–715.
- (191) Sulzmaier, F. J.; Jean, C.; Schlaepfer, D. D. FAK in Cancer: Mechanistic Findings and Clinical Applications. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14* (9), 598–610.
- (192) Cance, W. G.; Harris, J. E.; Iacocca, M. V.; Roche, E.; Yang, X.; Chang, J.; Simkins, S.; Xu, L. Immunohistochemical Analyses of Focal Adhesion Kinase Expression in Benign and Malignant Human Breast and Colon Tissues: Correlation with Preinvasive and Invasive Phenotypes. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6* (6), 2417–2423.
- (193) Hess, A. R.; Postovit, L.-M.; Margaryan, N. V.; Seftor, E. A.; Schneider, G. B.; Seftor, R. E. B.; Nickoloff, B. J.; Hendrix, M. J. C. Focal Adhesion Kinase Promotes the Aggressive Melanoma Phenotype. *Cancer Res.* **2005**, *65* (21), 9851–9860.
- (194) Furuyama, K.; Doi, R.; Mori, T.; Toyoda, E.; Ito, D.; Kami, K.; Koizumi, M.; Kida, A.; Kawaguchi, Y.; Fujimoto, K. Clinical Significance of Focal Adhesion Kinase in Resectable Pancreatic Cancer. *World J. Surg.* **2006**, *30* (2), 219–226.
- (195) Frisch, S. M.; Vuori, K.; Ruoslahti, E.; Chan-Hui, P. Y. Control of Adhesion-Dependent Cell Survival by Focal Adhesion Kinase. *J. Cell Biol.* **1996**, *134* (3), 793–799.
- (196) Almeida, E. A. C.; Ilić, D.; Han, Q.; Hauck, C. R.; Jin, F.; Kawakatsu, H.; Schlaepfer, D. D.; Damsky, C. H. Matrix Survival Signaling. *J. Cell Biol.* **2000**, *149* (3), 741–754.
- (197) Schlaepfer, D. D.; Mitra, S. K.; Ilic, D. Control of Motile and Invasive Cell Phenotypes by Focal Adhesion Kinase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2004**, *1692* (2–3), 77–102.
- (198) Wei, Y.; Wang, Y.; Liu, N.; Qi, R.; Xu, Y.; Li, K.; Feng, Y.; Shi, B. A FAK Inhibitor Boosts Anti-PD1 Immunotherapy in a Hepatocellular Carcinoma Mouse Model. *Front. Pharmacol.* **2022**, *12*.
- (199) Serrels, A.; Lund, T.; Serrels, B.; Byron, A.; McPherson, R. C.; von Kriegsheim, A.; Gómez-Cuadrado, L.; Canel, M.; Muir, M.; Ring, J. E.; Maniati, E.; Sims, A. H.; Pachter, J. A.; Brunton, V. G.; Gilbert, N.; Anderton, S. M.; Nibbs, R. J. B.; Frame, M. C. Nuclear FAK Controls Chemokine Transcription, Tregs, and Evasion of Anti-Tumor Immunity. *Cell* **2015**, *163* (1), 160–173.
- (200) Grädler, U.; Bomke, J.; Musil, D.; Dresing, V.; Lehmann, M.; Hölzemann, G.; Greiner, H.; Esdar, C.; Krier, M.; Heinrich, T. Fragment-Based Discovery of Focal Adhesion Kinase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (19), 5401–5409.
- (201) Golubovskaya, V. M.; Nyberg, C.; Zheng, M.; Kweh, F.; Magis, A.; Ostrov, D.; Cance, W. G. A Small Molecule Inhibitor 1,2,4,5-Benzenetetraamine Tetrahydrochloride,

- Targeting the Y397 Site of Focal Adhesion Kinase Decreases Tumor Growth. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (23), 7405–7416.
- (202) Kurenova, E. V.; Hunt, D. L.; He, D.; Magis, A. T.; Ostrov, D. A.; Cance, W. G. The Small Molecule Chloropyramine Hydrochloride (C4) Targets the Binding Site of Focal Adhesion Kinase and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 and Suppresses Breast Cancer Growth in Vivo. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (15), 4716–4724.
- (203) Canel, M.; Serrels, A.; Miller, D.; Timpson, P.; Serrels, B.; Frame, M. C.; Brunton, V. G. Quantitative In Vivo Imaging of the Effects of Inhibiting Integrin Signaling via Src and FAK on Cancer Cell Movement: Effects on E-Cadherin Dynamics. *Cancer Res.* **2010**, *70* (22), 9413–9422.
- (204) Seong, J.; Lu, S.; Wang, Y. Live Cell Imaging of Src/FAK Signaling by FRET. *Cell. Mol. Bioeng.* **2011**, *4* (2), 138–147.
- (205) Fang, Y.; Wang, D.; Xu, X.; Liu, J.; Wu, A.; Li, X.; Xue, Q.; Wang, H.; Wang, H.; Zhang, H. Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Dynamics (MD) Simulation Studies of Three Novel F-18 Labeled and Focal Adhesion Kinase (FAK) Targeted 5-Bromo Pyrimidines as Radiotracers for Tumor. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *127*, 493–508.
- (206) Qi, Y.; Li, Y.; Fang, Y.; Gao, H.; Qiang, B.; Wang, S.; Zhang, H. Design, Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Docking of 2,4-Diaminopyrimidine Derivatives Targeting Focal Adhesion Kinase as Tumor Radiotracers. *Mol. Pharm.* **2021**, *18* (4), 1634–1642.
- (207) Wang, D.; Fang, Y.; Wang, H.; Xu, X.; Liu, J.; Zhang, H. Synthesis and Evaluation of Novel F-18-Labeled Pyrimidine Derivatives: Potential FAK Inhibitors and PET Imaging Agents for Cancer Detection. *RSC Adv.* **2017**, *7* (36), 22388–22399.
- (208) Zhang, Z.; Wang, X.; Ye, J.; Liu, H.; Fang, J.; Zhang, M.; Li, Y.; Huang, J.; Zhang, D.; Wang, J.; Zhang, X. Development and Preclinical Evaluation of Radiolabeled Covalent G12C-Specific Inhibitors for Direct Imaging of the Oncogenic KRAS Mutant. *Mol. Pharm.* **2021**, *18* (9), 3509–3518.
- (209) Kuhnast, B.; de Bruin, B.; Hinnen, F.; Tavitian, B.; Dollé, F. Design and Synthesis of a New [¹⁸F]Fluoropyridine-Based Haloacetamide Reagent for the Labeling of Oligonucleotides: 2-Bromo-N-[3-(2-[¹⁸F]Fluoropyridin-3-Yloxy)Propyl]Acetamide. *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15* (3), 617–627.
- (210) Ian Storer, R.; Aciro, C.; Jones, L. H. Squaramides: Physical Properties, Synthesis and Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (5), 2330.

- (211) Lengkeek, N. A.; Roberts, M. P.; Zhang, L.; Lee, I.-C. J.; Fookes, C. J. R.; Dikic, B.; Herzog, H.; Katsifis, A.; Greguric, I. Synthesis and Binding Affinity of Fluorine Containing NG-Acyl and -Sulfonyl BIBP3226 Derivatives: Ligands for the NPY Y1 Receptor. *Aust. J. Chem.* **2016**, *69* (7), 746.
- (212) Steinhuebel, D.; Palucki, M.; Askin, D.; Dolling, U. Synthesis of N-Arylated Sultams: Palladium- and Copper-Catalyzed Cross Coupling of Aryl Halides with 1,4-Butane and 1,3-Propanesultams. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45* (16), 3305–3307.
- (213) Kobayashi, T.; Yasuno, T.; Takahashi, K.; Nakamura, S.; Mashino, T.; Ohe, T. Novel Pyridinium-Type Fullerene Derivatives as Multitargeting Inhibitors of HIV-1 Reverse Transcriptase, HIV-1 Protease, and HCV NS5B Polymerase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2021**, *49*, 128267.
- (214) Ansary, I.; Das, A.; Sen Gupta, P. S.; Bandyopadhyay, A. K. Synthesis, Molecular Modeling of N-Acyl Benzoazetines and Their Docking Simulation on Fungal Modeled Target. *Synth. Commun.* **2017**, *47* (15), 1375–1386.
- (215) Spiegel, S.; Milstien, S. Sphingosine-1-Phosphate: An Enigmatic Signalling Lipid. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4* (5), 397–407.
- (216) Keenan, R. W.; Maxam, A. The in Vitro Degradation of Dihydrosphingosine. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* **1969**, *176* (2), 348–356.
- (217) Melendez, A. J.; Carlos-Dias, E.; Gosink, M.; Allen, J. M.; Takacs, L. Human Sphingosine Kinase: Molecular Cloning, Functional Characterization and Tissue Distribution. *Gene* **2000**, *251* (1), 19–26. 5.
- (218) Hammad, S. M.; Taha, T. A.; Nareika, A.; Johnson, K. R.; Lopes-Virella, M. F.; Obeid, L. M. Oxidized LDL Immune Complexes Induce Release of Sphingosine Kinase in Human U937 Monocytic Cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2006**, *79* (1–2), 126–140.
- (219) Kim, M. Y.; Linardic, C.; Obeid, L.; Hannun, Y. Identification of Sphingomyelin Turnover as an Effector Mechanism for the Action of Tumor Necrosis Factor Alpha and Gamma-Interferon. Specific Role in Cell Differentiation. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266* (1), 484–489.
- (220) Gault, C. R.; Eblen, S. T.; Neumann, C. A.; Hannun, Y. A.; Obeid, L. M. Oncogenic K-Ras Regulates Bioactive Sphingolipids in a Sphingosine Kinase 1-Dependent Manner*. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (38), 31794–31803.

- (221) Cuvillier, O.; Pirianov, G.; Kleuser, B.; Vanek, P. G.; Coso, O. A.; Gutkind, J. S.; Spiegel, S. Suppression of Ceramide-Mediated Programmed Cell Death by Sphingosine-1-Phosphate. *Nature* **1996**, *381* (6585), 800–803.
- (222) Cuvillier, O. Sphingosine in Apoptosis Signaling. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **2002**, *1585* (2), 153–162.
- (223) Zhang, Y.; Wang, Y.; Wan, Z.; Liu, S.; Cao, Y.; Zeng, Z. Sphingosine Kinase 1 and Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS One* **2014**, *9* (2), e90362.
- (224) French, K. J.; Schrecengost, R. S.; Lee, B. D.; Zhuang, Y.; Smith, S. N.; Eberly, J. L.; Yun, J. K.; Smith, C. D. Discovery and Evaluation of Inhibitors of Human Sphingosine Kinase1. *Cancer Res.* **2003**, *63* (18), 5962–5969.
- (225) Ruckhäberle, E.; Rody, A.; Engels, K.; Gaetje, R.; von Minckwitz, G.; Schiffmann, S.; Grösch, S.; Geisslinger, G.; Holtrich, U.; Karn, T.; Kaufmann, M. Microarray Analysis of Altered Sphingolipid Metabolism Reveals Prognostic Significance of Sphingosine Kinase 1 in Breast Cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2008**, *112* (1), 41–52.
- (226) Van Brocklyn, J. R.; Jackson, C. A.; Pearl, D. K.; Kotur, M. S.; Snyder, P. J.; Prior, T. W. Sphingosine Kinase-1 Expression Correlates With Poor Survival of Patients With Glioblastoma Multiforme: Roles of Sphingosine Kinase Isoforms in Growth of Glioblastoma Cell Lines. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2005**, *64* (8), 695–705.
- (227) Xia, P.; Gamble, J. R.; Wang, L.; Pitson, S. M.; Moretti, P. A.; Wattenberg, B. W.; D’Andrea, R. J.; Vadas, M. A. An Oncogenic Role of Sphingosine Kinase. *Curr. Biol. CB* **2000**, *10* (23), 1527–1530.
- (228) Pchejetski, D.; Golzio, M.; Bonhoure, E.; Calvet, C.; Doumerc, N.; Garcia, V.; Mazerolles, C.; Rischmann, P.; Teissié, J.; Malavaud, B.; Cuvillier, O. Sphingosine Kinase-1 as a Chemotherapy Sensor in Prostate Adenocarcinoma Cell and Mouse Models. *Cancer Res.* **2005**, *65* (24), 11667–11675.
- (229) Sukocheva, O.; Wang, L.; Verrier, E.; Vadas, M. A.; Xia, P. Restoring Endocrine Response in Breast Cancer Cells by Inhibition of the Sphingosine Kinase-1 Signaling Pathway. *Endocrinology* **2009**, *150* (10), 4484–4492.
- (230) Rosa, R.; Marciano, R.; Malapelle, U.; Formisano, L.; Nappi, L.; D’Amato, C.; D’Amato, V.; Damiano, V.; Marfè, G.; Del Vecchio, S.; Zannetti, A.; Greco, A.; De Stefano, A.; Carlomagno, C.; Veneziani, B. M.; Troncone, G.; De Placido, S.; Bianco, R. Sphingosine Kinase 1 Overexpression Contributes to Cetuximab Resistance in Human Colorectal Cancer Models. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19* (1), 138–147.

- (231) Bonhoure, E.; Pchejetski, D.; Aouali, N.; Morjani, H.; Levade, T.; Kohama, T.; Cuvillier, O. Overcoming MDR-Associated Chemoresistance in HL-60 Acute Myeloid Leukemia Cells by Targeting Sphingosine Kinase-1. *Leukemia* **2006**, *20* (1), 95–102.
- (232) Shida, D.; Takabe, K.; Kapitonov, D.; Milstien, S.; Spiegel, S. Targeting SphK1 as a New Strategy against Cancer. *Curr. Drug Targets* **2008**, *9* (8), 662–673.
- (233) Jendiroba, D. B.; Klostergaard, J.; Keyhani, A.; Pagliaro, L.; Freireich, E. J. Effective Cytotoxicity against Human Leukemias and Chemotherapy-Resistant Leukemia Cell Lines by N-N-Diméthylsphingosine. *Leuk. Res.* **2002**, *26* (3), 301–310.
- (234) Coward, J.; Ambrosini, G.; Musi, E.; Truman, J.-P.; Haimovitz-Friedman, A.; Allegood, J. C.; Wang, E.; Merrill, A. H.; Schwartz, G. K. Safingol (L-Threo-Sphinganine) Induces Autophagy in Solid Tumor Cells through Inhibition of PKC and the PI3-Kinase Pathway. *Autophagy* **2009**, *5* (2), 184–193.
- (235) Spijkers, L. J.; Alewijnse, A. E.; Peters, S. L. FTY720 (Fingolimod) Increases Vascular Tone and Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats via Inhibition of Sphingosine Kinase. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *166* (4), 1411–1418.
- (236) Baek, D. J.; MacRitchie, N.; Anthony, N. G.; Mackay, S. P.; Pyne, S.; Pyne, N. J.; Bittman, R. Structure–Activity Relationships and Molecular Modeling of Sphingosine Kinase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (22), 9310–9327.
- (237) Paugh, S. W.; Paugh, B. S.; Rahmani, M.; Kapitonov, D.; Almenara, J. A.; Kordula, T.; Milstien, S.; Adams, J. K.; Zipkin, R. E.; Grant, S.; Spiegel, S. A Selective Sphingosine Kinase 1 Inhibitor Integrates Multiple Molecular Therapeutic Targets in Human Leukemia. *Blood* **2008**, *112* (4),
- (238) Bu, Y.; Wu, H.; Deng, R.; Wang, Y. Therapeutic Potential of SphK1 Inhibitors Based on Abnormal Expression of SphK1 in Inflammatory Immune Related-Diseases. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*.
- (239) Khan, F. I.; Lai, D.; Anwer, R.; Azim, I.; Khan, M. K. A. Identifying Novel Sphingosine Kinase 1 Inhibitors as Therapeutics against Breast Cancer. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2020**, *35* (1), 172–186.
- (240) Lin, H.; Baby, N.; Lu, J.; Kaur, C.; Zhang, C.; Xu, J.; Ling, E.-A.; Dheen, S. T. Expression of Sphingosine Kinase 1 in Amoeboid Microglial Cells in the Corpus Callosum of Postnatal Rats. *J. Neuroinflammation* **2011**, *8* (1), 13.
- (241) Lima, S.; Milstien, S.; Spiegel, S. A Real-Time High-Throughput Fluorescence Assay for Sphingosine Kinases. *J. Lipid Res.* **2014**, *55* (7), 1525–1530.

- (242) Ye, M.; Gai, Y.; Ji, H.; Jiang, Y.; Qiao, P.; Wang, W.; Zhang, Y.; Xia, X.; Lan, X. A Novel Radioimmune ^{99m}Tc -Labeled Tracer for Imaging Sphingosine 1-Phosphate Receptor 1 in Tumor Xenografts: An In Vitro and In Vivo Study. *Front. Immunol.* **2021**, *12*.
- (243) Luo, Z.; Gu, J.; Dennett, R. C.; Gaehle, G. G.; Perlmutter, J. S.; Chen, D. L.; Benzinger, T. L. S.; Tu, Z. Automated Production of a Sphingosine-1 Phosphate Receptor 1 (S1P1) PET Radiopharmaceutical [^{11}C]CS1P1 for Human Use. *Appl. Radiat. Isot.* **2019**, *152*, 30–36.
- (244) Qiu, L.; Jiang, H.; Yu, Y.; Gu, J.; Wang, J.; Zhao, H.; Huang, T.; Gropler, R. J.; Klein, R. S.; Perlmutter, J. S.; Tu, Z. Radiosynthesis and Evaluation of a Fluorine-18 Radiotracer [^{18}F]FS1P1 for Imaging Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1. *Org. Biomol. Chem.* **2022**, *20* (5), 1041–1052.
- (245) Trenkle, J. D.; Jamison, T. F. Macrocyclization by Nickel-Catalyzed, Ester-Promoted, Epoxide–Alkyne Reductive Coupling: Total Synthesis of (–)-Gloeosporone. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (29), 5366–5368.
- La mise à jour automatique des citations est désactivée. Pour voir la bibliographie, cliquez sur Actualiser dans l'onglet Zotero..
- (247) Kim, D.-Y.; Kim, H.-J.; Yu, K.-H.; Min, J.-J. Synthesis of [^{18}F]-Labeled (2-(2-Fluoroethoxy)Ethyl)Triphenylphosphonium Cation as a Potential Agent for Myocardial Imaging Using Positron Emission Tomography. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (1), 319–322.
- (248) Pottier, G.; Gómez-Vallejo, V.; Padro, D.; Boisgard, R.; Dollé, F.; Llop, J.; Winkeler, A.; Martín, A. PET Imaging of Cannabinoid Type 2 Receptors with [^{11}C]A-836339 Did Not Evidence Changes Following Neuroinflammation in Rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* **2017**, *37* (3), 1163–1178.
- (249) Feldman, A. T.; Wolfe, D. Tissue Processing and Hematoxylin and Eosin Staining. In *Histopathology: Methods and Protocols*; Day, C. E., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer: New York, NY, **2014**; 31–43.

Titre : Développement de radiotraceurs originaux pour l'imagerie TEP des dérégulations du cycle cellulaire en oncologie

Mots clés : imagerie TEP, oncologie, chimie organique, radiotraceur

Résumé : Le cycle de vie des cellules tumorales est régi par des protéines dérégulées comme p53, la focal adhesion kinase (FAK) ou encore la sphingosine kinase 1 (SK1) qui sont surexprimées ou inactivées dans un grand nombre de cancers et qui sont facteurs de mauvais pronostic. La tomographie par émission de positrons (TEP) est une technique d'imagerie moléculaire extrêmement sensible qui permettrait, grâce au développement de radiotraceurs spécifiques de ces protéines, de réaliser à la fois une imagerie pronostique de ces dérégulations mais également un suivi thérapeutique des patients, s'inscrivant alors dans une démarche de médecine personnalisée. Ce projet doctoral a alors pour objectifs de développer de nouveaux radiotraceurs spécifiques ciblant ces protéines dérégulées en s'inspirant de composés thérapeutiques de la littérature. Ces radiotraceurs sont marqués au carbone-11 ou au fluor-18, deux radio-isotopes de choix pour l'imagerie TEP. Le composé CP31398 est une molécule thérapeutique ciblant la protéine mutante p53. Au cours de ce projet doctoral, trois couples précurseur/référence inspirés de ce motif moléculaire ont été synthétisés. Un radiomarquage isotopique au carbone-11 automatisé a permis d'obtenir le radiotraceur [¹¹C]CP31398 sans modification de structure alors que deux dérivés fluorés, [¹⁸F]F-CP31398 et [¹⁸F]PEG-CP31398, ont également été obtenus. L'évaluation *in vitro* de ces radiotraceurs sur cellules tumorales ou transfectées avec un plasmide permettant l'expression de p53 n'a malheureusement pas permis de confirmer le ciblage de la protéine.

En collaboration avec le Laboratoire de Chimie et Biochimie Toxicologiques et Pharmacologiques (LCBPT) de l'Université Paris-Cité, qui possède une expertise dans le développement d'inhibiteurs covalents ciblant la protéine FAK, un couple précurseur/référence a été synthétisé pour le radiomarquage isotopique au carbone-11 d'un ligand de la protéine identifié par le LCBPT et nommé 7f. La mise au point du radiomarquage au carbone-11 en deux étapes de 7f, réalisée sur un composé modèle analogue de 7f, n'a permis d'obtenir que de faibles conversions, ne permettant pas de poursuivre l'évaluation *in vivo* de ce composé. En parallèle, la synthèse de différents analogues fluorés a été approchée. Si la synthèse de noyaux pyridines fonctionnalisés s'est avérée infructueuse et n'a pas permis d'obtenir les composés souhaités, un analogue du composé 7f comportant un noyau phényle et une chaîne fluorée est toujours en développement avec des résultats prometteurs. Enfin, en s'inspirant de la structure chimique des nombreux inhibiteurs décrits pour cibler la protéine SK1 et possédant une tête polaire ainsi qu'une queue hydrophobe, un couple précurseur/référence a été développé. La structure du composé FH-SK1 développé est analogue au composé PF-543, un puissant inhibiteur de la kinase. La molécule développée présente une chaîne aliphatique fluorée ainsi qu'un motif pyrrolidine méthanol. Le procédé de radiomarquage au fluor-18 en deux étapes de l'analogue [¹⁸F]FH-SK1 a été optimisé et automatisé et est prêt pour injection. Des mesures d'affinité du traceur pour SK1 sont en cours de réalisation sur cellules tumorales avant évaluation *in vivo*.

Title: Development of original PET radiotracers to image cell cycle deregulations in oncology

Keywords: PET imaging, oncology, organic chemistry, radiotracer

Abstract: The life cycle of tumor cells is governed by deregulated proteins such as p53, the focal adhesion kinase (FAK), and the sphingosine kinase 1 (SK1), which are overexpressed or inactivated in many cancers and serve as poor prognostic factors. Positron emission tomography (PET) is an extremely sensitive molecular imaging technique that, through the development of specific radiotracers targeting these proteins, could enable both prognostic imaging of these deregulations and therapeutic monitoring of patients, towards personalized medicine approaches. The objectives of this doctoral project are to develop new specific radiotracers labeled with either carbon-11 or fluorine-18, two preferred radioisotopes for PET imaging, targeting these deregulated proteins based on therapeutic compounds from the literature. The therapeutic compound CP31398 targets the mutant p53 protein. During this doctoral project, three precursor/reference pairs inspired by this molecular motif were synthesized. Automated carbon-11 isotopic radiolabeling afforded the radiotracer [¹¹C]CP31398 without any structural modification, while two fluorinated derivatives, [¹⁸F]F-CP31398 and [¹⁸F]PEG-CP31398, were also obtained. Unfortunately, the *in vitro* evaluation of these radiotracers on tumor cells or cells transfected with a plasmid expressing p53 did not confirm the specific targeting of the protein.

In collaboration with the Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques (LCBPT) at the Paris-Cité University, which possesses expertise in developing covalent inhibitors targeting FAK protein, a precursor/reference pair was synthesized for carbon-11 isotopic radiolabeling of a ligand identified by LCBPT, called 7f. The two steps carbon-11 radiolabeling process performed on a model compound analogue of 7f only resulted in low conversions, preventing further *in vivo* evaluation of this compound. Simultaneously, the synthesis of various fluorinated analogs was attempted. While the synthesis of functionalized pyridine moieties did not give successful results, an analogue of compound 7f containing a phenyl ring and a fluorinated aliphatic chain is still under development with promising results. Finally, inspired by the chemical structure of numerous inhibitors described to target SK1, which possesses a polar head and hydrophobic tail, a precursor/reference pair was developed. The structure of the designed FH-SK1 compound is analogue to compound PF-543, a potent sphingosine kinase 1 inhibitor. The developed molecule features a long aliphatic chain and a pyrrolidine methanol motif. The two-step fluorine-18 radiolabeling process of [¹⁸F]FH-SK1 has been optimized and automated and is now ready for injection. Affinity measurements of the tracer for SK1 are currently being conducted on tumor cells before *in vivo* evaluation.