

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ

Année 2010

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

**Nouvelle méthode de radiomarquage des anticorps
à l'astate-211 hypervalent pour la radioimmunothérapie
alpha des cancers**

THÈSE DE DOCTORAT

**Discipline : Chimie organique
Spécialité : Radiochimie**

*Présentée
et soutenue publiquement par*

François GUÉRARD

Le 15 octobre 2010, devant le jury ci-dessous

Président du jury :

Dr Jacques BARBET Directeur de recherche CNRS/INSERM U892, Nantes

Rapporteurs :

Pr Éric FOUQUET Professeur des universités.- Institut des sciences
moléculaire. Université de Bordeaux 1

Dr Raphaël TRIPIER Chargé de recherche, UMR CNRS 6521
Université de Bretagne occidentale

Examineurs :

Dr Stéphanie LEGOUPY Chargée de recherche, UMR CNRS 6200
Université d'Angers

Pr Geerd J. MEYER Professeur, Klinik für Nuklearmedizin
Medizinische Hochschule Hannover

Directeur de thèse :

Dr. Jean-François GESTIN, Directeur de recherche INSERM U892, Nantes

« Je suis convaincu que la recherche, considérée comme un espace de liberté et de création, a encore de beaux jours devant elle. Elle doit rester une terre de jeu et d'aventure où s'exprime le goût du risque et de la contestation. Encore faut-il que les chercheurs de toutes générations s'opposent à une évolution vers toujours plus de rentabilité à court terme qui pourrait les éloigner de leur véritable vocation de créateurs »

Pierre Joliot

TABLE DES MATIÈRES

PRÉAMBULE.....	1
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	7
III. VECTORISATION TUMORALE IMMUNOSPECIFIQUE DES RADIOPHARMACEUTIQUES.....	9
<i>III-1. Le vecteur immunologique</i>	<i>10</i>
III-1-1. Description de l'anticorps	10
III-1-2. Ingénierie des anticorps	12
III-1-3. Ciblage des cellules tumorales.....	14
III-1-3-1. Ciblage direct.....	14
III-1-3-2. Méthodes de préciblage	15
<i>III-2. Méthodes de radiomarquage des anticorps.....</i>	<i>17</i>
<i>III-3. Le radionucléide</i>	<i>20</i>
III-3-1. Les radionucléides utiles en imagerie.....	21
III-3-1-1. Les émetteurs gamma.....	21
III-3-1-2. Les émetteurs bêta plus	22
III-3-2. Les radionucléides utilisables en thérapie.....	24
III-3-2-1. Les émetteurs bêta moins.....	24
III-3-2-2. Les émetteurs alpha	26
III-3-2-3. Les émetteurs d'électrons Auger	28
IV. L'ASTATE-211, RADIONUCLEIDE PROMETTEUR POUR LA RADIOIMMUNOTHERAPIE ALPHA DES CANCERS. 29	
<i>IV-1. Caractéristiques de l'astate-211 et production</i>	<i>29</i>
IV-1-1. Propriétés physiques de l'astate-211	29
IV-1-2. Production de l'astate-211	31
IV-1-3. Purification de l'astate-211.....	33
<i>IV-2. Propriétés chimiques de l'astate</i>	<i>34</i>
IV-2-1. Les états d'oxydation de l'astate	35
IV-2-2. Complexation de l'astate	37
IV-2-3. Chimie de covalence de l'astate.....	40
IV-2-3-1. La liaison carbone-astate	40
IV-2-3-2. La liaison bore-astate	46
<i>IV-3. Marquage de protéines à l'astate-211 pour la radioimmunothérapie alpha.</i>	<i>47</i>
IV-3-1. Nécessité d'un marquage indirect.....	47
IV-3-2. L'instabilité du marquage via le SAB.....	49
IV-3-3. Vers une introduction prochaine de l'astate-211 en clinique ?	51
IV-3-3-1. Expérimentations <i>in vitro</i>	51
IV-3-3-2. Essais précliniques	52
IV-3-3-3. Essais cliniques phase I.....	53
V. L'IODE HYPERVALENT : MODELE POUR LA STABILISATION DES MARQUAGES A L'ASTATE-211 ?	55
<i>V-1. La liaison hypervalente.</i>	<i>55</i>
V-1-1. Règle de l'octet et hypervalence	55

V-1-2. La remise en cause du concept d'hypervalence	57
V-2. <i>Propriétés des iodes hypervalents</i>	59
V-3. <i>Stabilisation de l'état d'oxydation (III)</i>	61
RÉSULTATS	63
INTRODUCTION : PRESENTATION DU SUJET DE RECHERCHE.....	65
I. MISE AU POINT DE LA METHODE SUR UN MODELE SIMPLE	67
I-1. <i>Synthèse du précurseur stannique</i>	67
I-1-1. Méthode directe.....	67
I-1-2. Choix d'un groupement protecteur	69
I-2. <i>Synthèse des références iodées froides</i>	72
I-3. <i>Mise au point du marquage à l'iode-125</i>	76
I-3-1. Iododestannylation avec l'iode-125	76
I-3-2. Formation des composés hypervalents	80
I-4. <i>Marquage à l'astate-211</i>	82
I-4-1. Radiomarquage par voie humide (avec de l'astate-211 obtenu par extraction liquide/liquide) .	83
I-4-1-1. Description de la méthode d'extraction.....	83
I-4-1-2. Radiomarquage du précurseur	85
I-4-2. Radiomarquage par voie sèche (avec de l'astate-211 obtenu par distillation).....	88
I-4-2-1. Mise en place de la méthode au laboratoire.....	88
I-4-2-2. Radiomarquage : étape d'astatodéstannylation	93
I-4-2-3. Formation des espèces hypervalentes	96
I-5. <i>Conclusion sur la formation des espèces hypervalentes astatées</i>	97
II. DEVELOPPEMENT ET RADIOMARQUAGE DES PRECURSEURS BIFONCTIONNALISES	99
II-1. <i>Méthode générale d'accès aux précurseurs</i>	99
II-2. <i>Couplage à la biotine</i>	103
II-2-1. Synthèse de la biotine stannylée.....	103
II-2-2. Préparation des références analytiques iodées.....	104
II-2-3. Radiomarquage	104
II-3. <i>Précurseur activé en NHS</i>	105
II-3-1. Synthèse du précurseur	105
II-3-2. Préparation des références iodées.....	106
II-3-3. Radiomarquages	106
II-4. <i>N-méthylation du précurseur activé en NHS</i>	107
II-4-1. Synthèse des précurseurs et des références iodées.....	107
II-4-2. Radiomarquages	110
II-5. <i>Précurseurs activés sous forme de maléimide</i>	112
II-5-1. Synthèse des précurseurs stanniques.....	112
II-5-2. Radiomarquages	114
II-5-3. Couplage à la BSA et stabilité <i>in vitro</i>	115
II-6. <i>Conclusion</i>	116
CONCLUSION GÉNÉRALE	119

PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	129
I. SYNTHÈSES CHIMIQUES	131
II. RADIOMARQUAGES DES PRECURSEURS	181
III. COUPLAGE A LA BSA DES COMPOSES RADIOMARQUES A L'ASTATE-211 ET STABILITE SERIQUE.....	188
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	189
LISTE DES SYMBOLES ET ABBRÉVIATIONS	199

PRÉAMBULE

Avec 145 762 décès et 319 380 nouveaux cas détectés, le cancer est la première cause de mortalité en France en 2005¹.

La chirurgie est aujourd'hui le traitement de première intention dans la majorité des cas avec 50 % des cancers guéris par cette méthode, mais les dernières décennies ont aussi vu le développement de la chimiothérapie. Ces deux types de traitement, souvent utilisés de façon complémentaire peuvent toutefois présenter des inconvénients. La chirurgie peut nécessiter l'élimination de quantités importantes de tissus sains aux alentours de la tumeur pour limiter les risques de cancers résiduels et la chimiothérapie conduit souvent à l'apparition d'effets secondaires mais également à des phénomènes de résistance pouvant conduire au retour de la maladie sous des formes plus agressives.

La troisième méthode de traitement la plus répandue est la radiothérapie externe. Cette-ci utilise les rayonnements ionisants pour détruire les cellules cancéreuses. Cette méthode, si elle a aujourd'hui prouvé son efficacité pour certaines pathologies, présente également l'inconvénient d'altérer les tissus sains traversés par les rayonnements et ne convient pas aux tumeurs de plus petites tailles. Pour limiter ces effets indésirables, l'idée de développer des méthodes de radiothérapie interne en utilisant les rayonnements émis par des atomes radioactifs amenés au plus près des cellules tumorales a donné naissance à la médecine nucléaire. Cette discipline a ouvert de nouvelles perspectives pour le traitement et le diagnostic des cancers.

Les prémices de ce qui donnera naissance à la radiothérapie puis à la médecine nucléaire apparaissent à la fin du 19^e siècle avec la découverte des rayons X en 1895 par le physicien allemand Wilhelm Röntgen. Il observe l'existence de rayonnements capables de traverser certains matériaux tels que le papier ou le verre mais qui sont stoppés par une épaisseur de plomb ou de platine². De plus, ces rayonnements sont capables d'impressionner une plaque photographique. Röntgen réalise peu de temps après la première radiographie de l'histoire, celle de la main de son épouse. Dès 1896 Etienne Destot ouvre le premier service de radiologie à Lyon et a l'ingénieuse idée de traiter une tumeur de l'estomac avec des rayons X. Le résultat observé est une diminution de la masse tumorale et un effet bénéfique sur la douleur. Avec la découverte de la radioactivité naturelle par Henri Becquerel et du radium par Pierre et Marie Curie en 1898, les possibilités de traitement des cancers par les rayonnements ionisants prennent rapidement forme.

La première moitié du 20^e siècle verra le développement de l'irradiation externe par le radium et de l'irradiation par implantation de sources radioactives au contact de la tumeur appelée curie thérapie. Ces deux techniques, dont les principes sont toujours utilisés aujourd'hui, sont regroupées sous le terme de radiothérapie externe. Les limitations dues

aux caractéristiques des radioisotopes connus alors en nombre limité sont rapidement levées avec la découverte de la radioactivité artificielle en 1934 par Irène et Frédéric Joliot-Curie, ce qui permet l'accès à un grand nombre de nouveaux radionucléides. L'obtention d'isotopes radioactifs de l'iode est alors possible et l'exploitation des propriétés biologiques de cet élément, notamment son fort tropisme pour la thyroïde, permet à partir de 1941 le diagnostic de l'hyperthyroïdie et son traitement avec de l'iode-130 injecté directement à des patients. Il est rapidement remplacé par l'iode-131 aux caractéristiques plus favorables, qui est aujourd'hui encore incontournable pour le traitement des cancers différenciés de la thyroïde.

La démonstration est faite qu'il est possible d'injecter à un patient un atome radioactif dans un but thérapeutique ou diagnostique. L'idée d'associer des radionucléides à une molécule ayant des propriétés de ciblage permet de poser les principales bases de la médecine nucléaire actuelle. La seconde moitié du 20^e siècle jusqu'à aujourd'hui verra une amélioration permanente des différentes techniques évoquées ci-dessus avec l'utilisation de radionucléides aux caractéristiques de mieux en mieux adaptées, le développement de vecteurs permettant de cibler différents types de cancers (dérivés du glucose, peptides, anticorps, etc.) et les évolutions technologiques des techniques d'imagerie dont le développement de détecteurs de radioactivité de plus en plus sensibles et précis (gamma caméra, scanners, etc.)

La médecine nucléaire a aujourd'hui permis de révolutionner le diagnostic de nombreux cancers avec un rapide développement des applications en scintigraphie avec le technétium-99m représentant près de 90 % de l'activité en médecine nucléaire entre les années 1970 et 2000. Les années 2000 voient quant à elles actuellement une explosion du développement des diagnostics par tomographie par émission de positons (TEP) en particulier avec l'utilisation du [¹⁸F]-FDG, un analogue du glucose permettant la visualisation de nombreuses pathologies, cancéreuses ou autres.

En comparaison avec les nombreuses applications en diagnostic, la thérapie par vectorisation tumorale de radionucléides est aujourd'hui encore assez peu développée malgré les efforts de recherches engagés. L'avantage que présente la radiothérapie vectorisée est sa grande modularité. De nombreux cancers pourraient théoriquement être traités par cette méthode, si l'on associe un vecteur et un radionucléide adaptés. Il existe aujourd'hui en clinique des traitements basés sur l'association d'anticorps et de radionucléides émetteurs bêta (cas du Zevalin, un anticorps radiomarqué à l'yttrium-90 ciblant les cellules de lymphome). Utilisé seul, en complément d'une chimiothérapie ou après chirurgie, ce type de traitement a aujourd'hui prouvé son efficacité sur les tumeurs

macroscopiques. Toutefois, le traitement des tumeurs de plus petites tailles par cette méthode reste aujourd'hui encore problématique à cause de la trop longue distance d'irradiation des émetteurs bêta (plusieurs millimètres), conduisant à de l'irradiation non spécifique avec un faible ratio tumeur/tissus sains irradiés.

Pour tenter de compléter ce manque dans l'arsenal thérapeutique du traitement des petites tumeurs, les émetteurs alpha ont vu leur intérêt croître ces dernières années. De par leur très faible pouvoir pénétrant (de l'ordre de quelques cellules) et leur très haute cytotoxicité, les particules alpha présentent un intérêt grandissant pour le traitement des tumeurs microscopiques. Les émetteurs alpha pourraient ainsi être une solution pour le traitement des cancers résiduels ou des petites tumeurs disséminées.

L'astate-211 est un des émetteurs alpha les plus prometteurs, en raison de sa demi-vie adaptée (7,2h) et de sa décroissance conduisant à 100% d'émission alpha. Étudié depuis une trentaine d'années dans le cadre de la radiothérapie vectorisée et en particulier par ciblage immunologique, l'astate-211 n'a toujours pas trouvé d'applications cliniques à ce jour en raison de la mauvaise stabilité de la liaison entre l'astate-211 et son vecteur. Ce manque de stabilité conduit à la libération du radionucléide dans l'organisme avec pour conséquence l'irradiation non spécifique d'organes sains.

Les connaissances des propriétés chimiques de l'astate sont aujourd'hui encore incomplètes. Une des raisons principales est la courte demi-vie de ses différents isotopes connus (8,1 h maximum pour l'astate-210) limitant les possibilités techniques d'expérimentation. La faible disponibilité de ce radioélément qui nécessite pour sa production l'emploi de cyclotrons à haute énergie peu répandus a également limité les recherches depuis sa découverte. Conjointement avec la mise en place du cyclotron ARRONAX de haute énergie et haute intensité dans la région Nantaise et dans le but de permettre une introduction future de l'astate-211 dans les traitements des cancers et d'enrichir les connaissances de la chimie de ce radioélément, cette thèse a eu pour objectif l'étude d'une méthode originale de marquage des anticorps avec de l'astate-211 sous une nouvelle forme appelée hypervalente. Ces recherches sont intégrées au projet européen TARCC (Targeting Alpha-Particle Emitting Radionuclides to Combat Cancer) ayant pour but le développement de la radiothérapie alpha.

Ce mémoire est divisé en deux parties. La première est une introduction au contexte général de ce projet de recherche, avec une présentation des principes de base de la vectorisation tumorale des radionucléides dans le cadre du ciblage immunologique, suivis d'une revue des propriétés et de l'utilisation de l'astate-211 puis du concept de liaison hypervalente. La deuxième partie abordera les travaux réalisés, avec la démonstration de la

possibilité de former des composés organiques de l'astate hypervalent, ainsi qu'une méthode permettant de radiomarquer les anticorps avec cette nouvelle forme de l'astate.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

III. Vectorisation tumorale immunospécifique des radiopharmaceutiques.

Le terme radiopharmaceutique désigne l'association d'un radionucléide à un vecteur pour des applications diagnostiques ou thérapeutiques. Ce concept issu de l'idée de « Magic Bullet » capable de cibler les maladies du corps humain imaginée par Paul Ehrlich permet théoriquement de cibler très précisément l'organe ou la tumeur souhaités si l'on choisit le radionucléide et le vecteur les mieux adaptés. Si ce cas idéal est encore loin d'être atteint, les progrès permettent aujourd'hui l'emploi de vecteurs à la pharmacocinétique de mieux en mieux adaptée. Ces améliorations constantes tendent vers une limitation de la fixation non spécifique de la radioactivité dans les organes sains et une optimisation de la dose délivrée au niveau de la tumeur pour de plus grandes efficacités et sécurités des traitements, ou l'obtention d'images de meilleures résolutions. Dans certains cas, le radionucléide lui-même peut jouer le rôle de vecteur. C'est le cas de l'iode qui s'accumule naturellement dans la thyroïde. Il est largement utilisé sous forme d'iodure pour les pathologies thyroïdiennes en diagnostic (iode-123) ou en thérapie (iode-131). Pour les autres éléments, des vecteurs spécifiques ont été développés. Le radiomarquage de nombreuses molécules bioactives a été étudié, en particulier de nombreux peptides ayant pour cible des récepteurs présents à la surface de certaines cellules cancéreuses. Les plus étudiées sont les analogues de la somatostatine, une hormone naturellement présente dans l'organisme dont les récepteurs sont surexprimés dans certains cancers³. En raison de l'activité accélérée des cellules cancéreuses et de leur surconsommation de glucose, des analogues de ce sucre ont également été préparés. Le plus célèbre, le [¹⁸F]-fluorodéoxyglucose (FDG) est aujourd'hui couramment utilisé en diagnostic. D'autres vecteurs de type colloïde font aussi l'objet d'une recherche active pour la vectorisation avec notamment le développement des liposomes et des nanoparticules⁴.

Ces trente dernières années ont vu l'émergence d'une nouvelle méthode de ciblage faisant appel à des anticorps et à leurs dérivés ciblant les antigènes surexprimés à la surface des cellules cancéreuses. Ils ont permis le développement du radioimmunodiagnostic et de la radioimmunothérapie.

III-1. Le vecteur immunologique

III-1-1. Description de l'anticorps

Les anticorps (ou immunoglobulines) sont des glycoprotéines naturellement produites par les plasmocytes. Ils font partie des effecteurs du système immunitaire des mammifères. Au cours de la réponse immunitaire, suite à l'intrusion d'un corps étranger (bactérie, virus, toxine, etc.), le rôle des anticorps est de reconnaître et de se fixer aux protéines (antigènes) présentes spécifiquement à la surface de ces agents pathogènes. L'activation de divers événements immunitaires par les anticorps permet alors la destruction et l'élimination de ces corps étrangers (Figure 1).

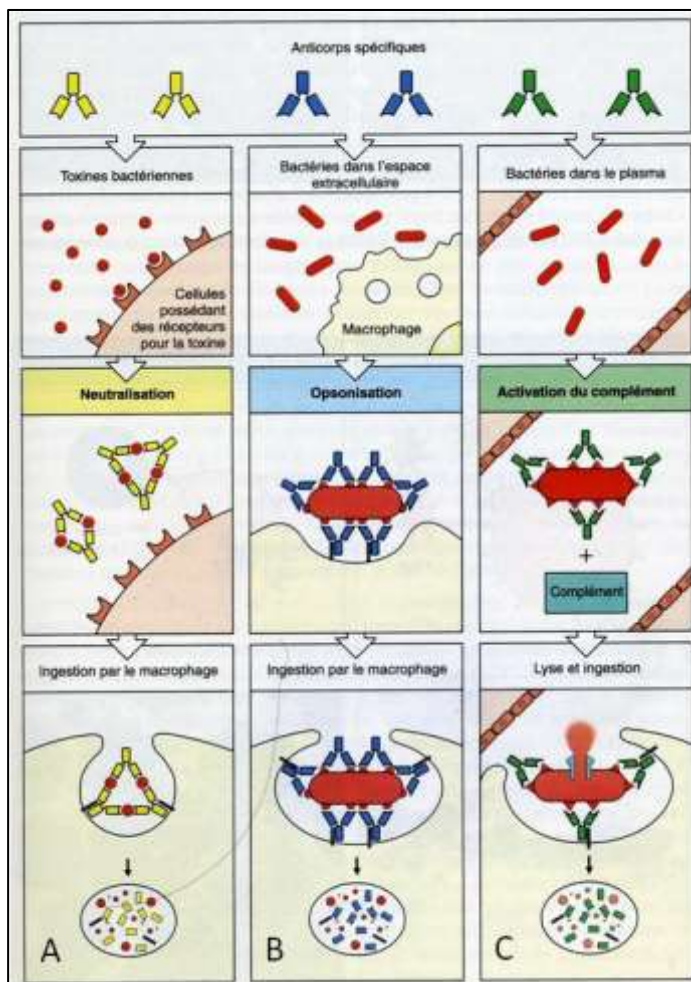


Figure 1 : Principaux types d'action des anticorps lors de la réaction immunitaire. Dans la colonne (A), les anticorps se lient et neutralisent une toxine bactérienne, ce qui l'empêche de se fixer aux récepteurs de la cellule et de causer la pathologie. Le complexe toxine-anticorps est alors détruit après ingestion par les macrophages. Dans la colonne (B), Les anticorps complexés aux antigènes d'une bactérie permettent aux phagocytes de la reconnaître et de l'ingérer, c'est le phénomène d'opsonisation. La colonne (C) montre l'activation du complément par les anticorps fixés sur une bactérie. Les anticorps servent de récepteurs à d'autres protéines qui conduiront directement à la destruction de la bactérie ou favoriseront sa capture par les phagocytes.

Les anticorps sont divisés en cinq classes aux structures et aux propriétés particulières : les IgG (immunoglobulines G), les IgD, les IgA, les IgE et les IgM. Ce sont les IgG qui sont naturellement les plus abondantes (70 à 75% des anticorps) et qui sont

principalement utilisées pour l'immunociblage. Elles sont constituées de quatre chaînes polypeptidiques liées en elles par des ponts disulfures leur conférant une forme de Y : deux chaînes légères d'environ 25 kDa (notées light ou L), deux chaînes lourdes d'environ 50 kDa (notées heavy ou H). Les extrémités des deux bras du Y, identiques entre elles pour un anticorps donné, constituent la région variable. Il s'agit du site de reconnaissance des antigènes. Le reste de l'anticorps correspond à la région constante, les aminoacides la composant variant très peu au sein d'une même espèce (Figure 2). C'est la région constante qui déclenche la cascade d'événements de la réaction immunitaire.

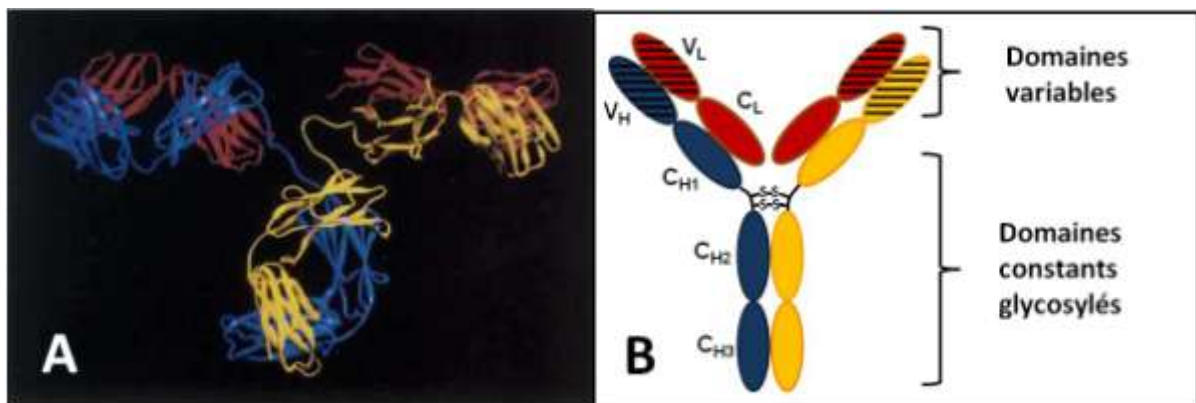


Figure 2 : structure d'un anticorps. En (A), structure cristallographique obtenue par rayon X d'après L.J. Harris⁵. Les chaînes lourdes apparaissent en bleu et jaune, les chaînes légères en rouge. En (B), représentation simplifiée avec le domaine variable hachuré, constitué d'une partie de chaîne lourde (V_H) et de chaîne légère (V_L). Le domaine constant est constitué du reste des chaînes lourdes (fragments C_H) et légères (C_L).

La production d'anticorps à visée médicale a longtemps été problématique. Les premières méthodes développées consistaient à générer une réponse immunitaire sur des mammifères ce qui conduisait à la production de mélanges de molécules difficilement isolables. Les lots d'anticorps produits étaient non reproductibles car polyclonaux, chaque animal immunisé donnant une réponse variable conduisant à une composition d'anticorps différente. Ce problème a été résolu en 1975 par G. Köhler et C. Milstein⁶ qui ont eu l'idée de fusionner des cellules de myélome de souris avec des cellules spléniques de souris immunisées. Les lignées de cellules ainsi formées, désignées sous le terme d'hybridome, possèdent ainsi la capacité des cellules de myélome à proliférer indéfiniment, et également la capacité de production d'anticorps héritée de la cellule immunisée. Les cellules ainsi produites peuvent alors être sélectionnées par différentes techniques dont la plus couramment utilisée et celle de la dilution limite. Cette technique permet ainsi d'obtenir des clones cellulaires ne produisant qu'un seul type d'anticorps appelé anticorps monoclonal (mAb).

III-1-2. Ingénierie des anticorps

Si la technique de l'hybridation a permis de s'affranchir des problèmes de reproductibilité de production, le fait que les anticorps produits soient d'origine murine a rapidement posé des problèmes de réactions immunitaires lors de l'administration à l'homme. Ce phénomène est d'autant plus important pour les traitements nécessitant plusieurs injections durant lesquels le patient peut développer une immunisation dès la première injection voire une réaction d'hypersensibilisation et d'intolérance pouvant être létale.

Les solutions apportées par le génie génétique ont permis l'obtention d'anticorps chimériques (Ach) homme-souris dont la partie variable est d'origine murine et la région constante d'origine humaine. Le risque de réaction immunitaire est alors largement diminué par rapport aux anticorps purement murins. Toutefois, le risque de production d'anticorps anti-Ach n'est pas totalement éliminé. C'est pourquoi les anticorps humanisés ont ensuite été développés. A 90-95 % humain, seules les parties hypervariables nécessaires à la reconnaissance tumorale sont incorporées à l'anticorps (Figure 3). L'anticorps idéal serait à 100 % humain pour s'affranchir totalement des problèmes d'immunogénicité cependant, les techniques actuelles, encore en développement, ne permettent pas de productions à grande échelle pour des applications thérapeutiques.

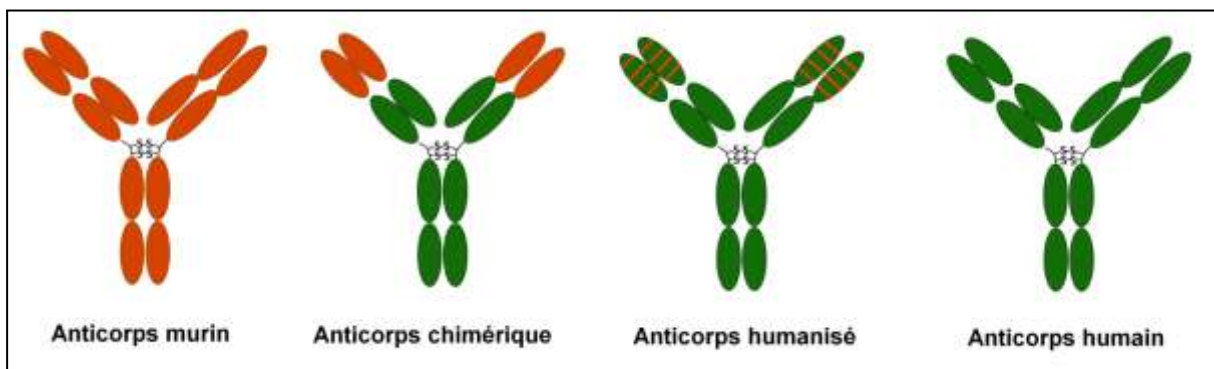


Figure 3 : hybridation des anticorps, avec les fragments d'origine humaine en vert et murine en orange.

La biochimie a également permis la modification des anticorps afin d'en moduler les caractéristiques de biodistribution et d'optimiser la dose de radioactivité reçue par la tumeur par rapport aux organes sains. Des méthodes de digestion enzymatique et de réduction permettent d'obtenir des fragments d'anticorps. Seule la région variable étant utile à la reconnaissance des antigènes, l'élimination des fragments n'ayant pas de fonctions indispensables à la vectorisation du radionucléide a été envisagée (Figure 4). Les molécules obtenues au poids moléculaire plus faible ont un temps de circulation sanguine plus court ce qui leur permet d'atteindre les tumeurs plus rapidement et avec une meilleure pénétration

dans les tissus cancéreux limitant ainsi la dose reçue par les organes sains. Ceci est particulièrement utile pour la vectorisation d'isotopes de courte demi-vie.

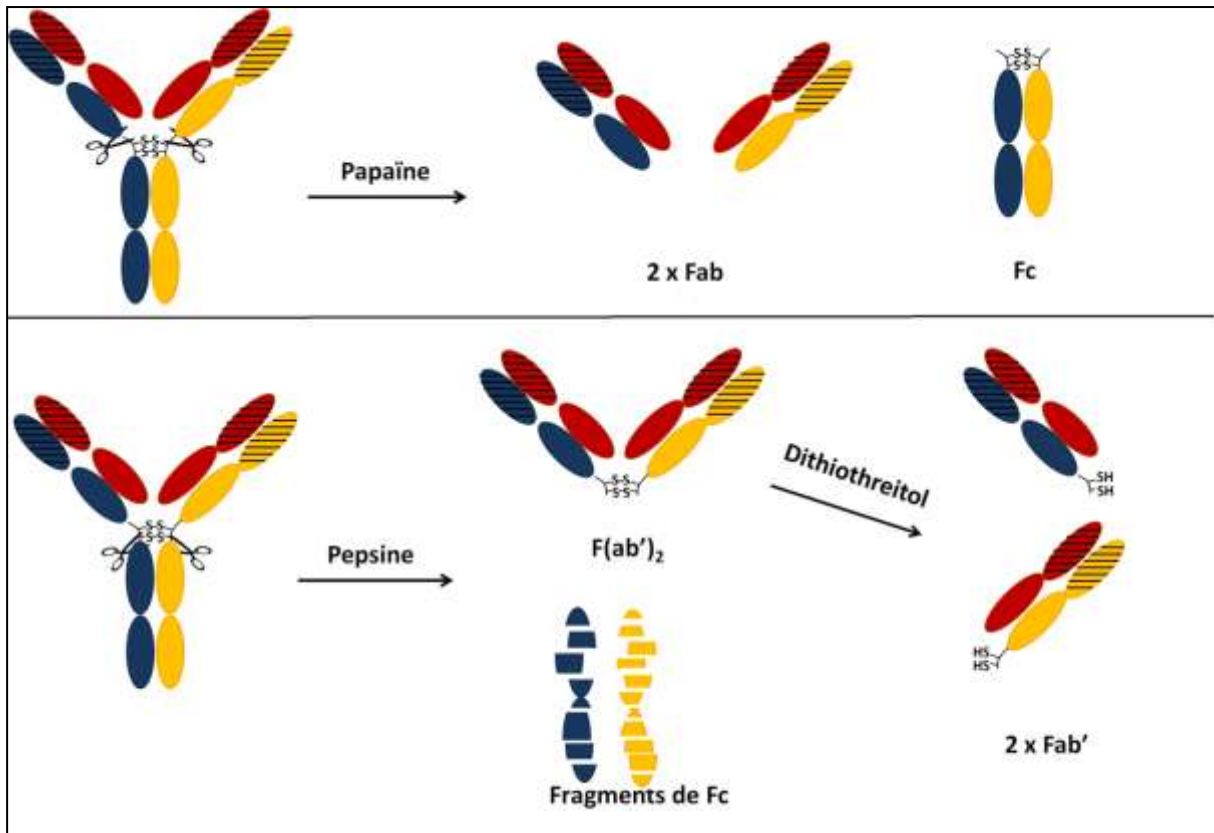


Figure 4 : Fragmentation des anticorps. La papaïne est une enzyme qui permet de fractionner l'anticorps en deux fragments Fab et un fragment Fc (cristallisable). La pepsine permet de fractionner l'anticorps en un fragment F(ab')₂, le fragments Fc étant digéré en plusieurs sous unités. Le F(ab')₂ peut à son tour être fragmenté en deux Fab' par réduction avec le dithiothréitol des ponts disulfures les reliant (réducteur plus efficace et moins toxique que le mercaptoéthanol utilisé auparavant).

En revanche, ces fragments sont plus rapidement éliminés par l'organisme, ce qui peut aussi réduire la dose de radioactivité déposée à la tumeur. De plus, les plus petits fragments (Fab') ne possèdent plus qu'un site de reconnaissance contre deux pour un anticorps entier ou un F(ab')₂, ce qui a tendance à diminuer leur affinité pour l'antigène. Différentes techniques liées au génie génétique ont permis l'obtention de nouvelles structures issues de la recombinaison de différents fragments d'anticorps⁷. Il est ainsi possible d'isoler la partie variable constituée des fragments V_H et V_L reliés entre eux par un linker pour former un fragment noté ScFv. Utilisé tel quel, c'est un composé qui diffusera vers la tumeur et sera éliminé de la circulation sanguine très rapidement. Lorsqu'il est recombiné avec des fragments de région constante, sa cinétique de biodistribution peut être modulée. L'association de plusieurs fragments ScFv entre eux permet la génération d'espèces bivalentes, trivalentes voire tétravalentes aux affinités accrues pour l'antigène considéré (Figure 5).

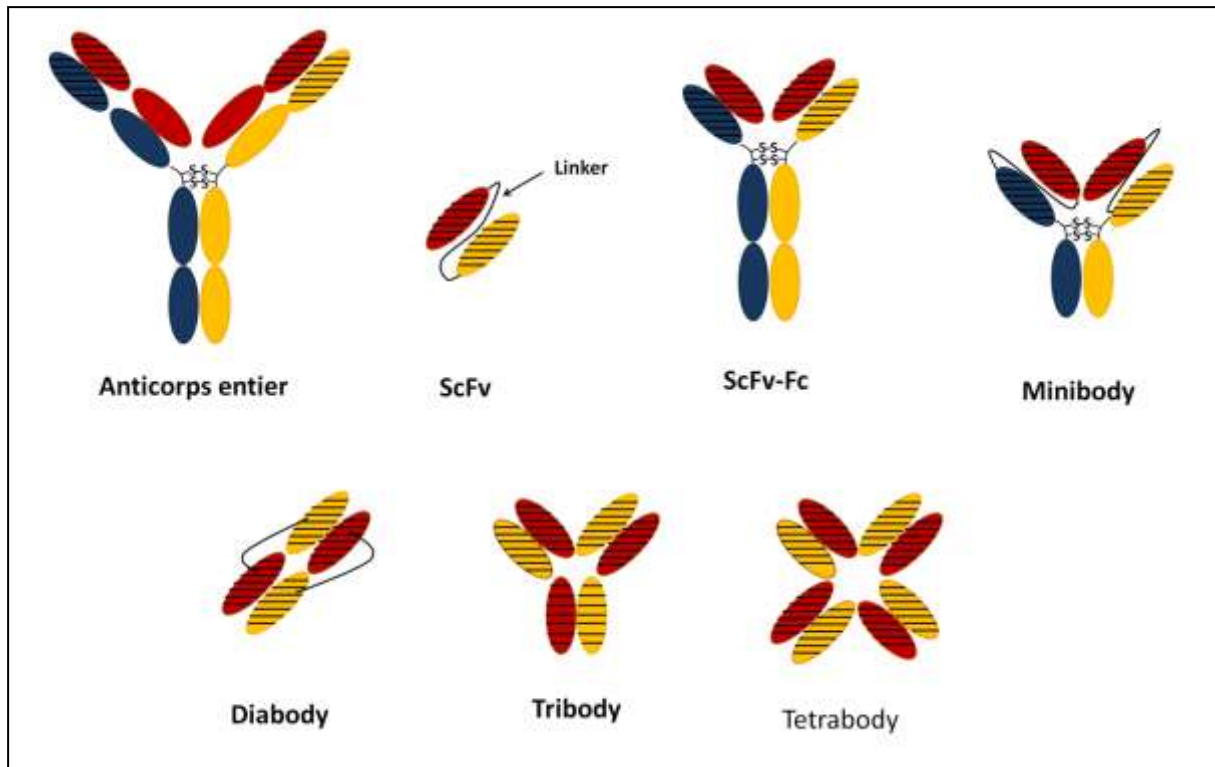


Figure 5 : exemples de structures issues de l'ingénierie des anticorps.

III-1-3. Ciblage des cellules tumorales

Le ciblage des tumeurs par les anticorps radiomarqués est basé sur la reconnaissance des antigènes présents sur les cellules tumorales. L'efficacité du ciblage sera dépendante de la densité antigénique des tumeurs et de leur accessibilité. De plus, la spécificité du ciblage qui doit être optimale pour limiter l'irradiation des tissus sains dépendra également de l'importance de l'expression de l'antigène sur les cellules non cancéreuses. Dans le cas idéal, les antigènes ciblés seraient exprimés uniquement sur les tumeurs. C'est le cas des antigènes modifiés suite à la mutation d'un gène lors de la formation du cancer. Mais ces mutations sont généralement propres à chaque patient et si elles permettraient en théorie d'appliquer une thérapie spécifique à chaque individu, ceci est irréalisable d'un point de vue pratique. Les antigènes réellement exploités sont donc des antigènes présents sur les cellules saines, mais surexprimés sur les cellules cancéreuses et accessibles au vecteur (cas du CD20 dans le lymphome non-hodgkinien, ou de l'ACE dans certains cancers colorectaux). Des techniques de ciblage en un ou plusieurs temps exploitant ces particularités ont été développées.

III-1-3-1. Ciblage direct

Le ciblage direct est la première méthode à avoir été utilisée. C'est aussi la plus simple à mettre en œuvre. L'anticorps radiomarqué (ou un de ses fragments ou dérivés) est

dans ce cas injecté directement dans la tumeur ou par voie intraveineuse. Un certain pourcentage diffuse jusqu'à la tumeur, le reste est excrété hors de l'organisme. Dans le cadre du radioimmunodiagnostic, le temps nécessaire avant acquisition des images avec un contraste optimal sera dépendant de la cinétique de l'anticorps et du moment où le ratio d'anticorps circulant sera le plus faible par rapport à l'anticorps fixé sur la tumeur. Pour la radiomunothérapie des limitations plus importantes peuvent apparaître, avec notamment l'irradiation des tissus sains pendant la circulation de l'anticorps dans l'organisme. Ceci est particulièrement valable pour les anticorps entiers à la cinétique lente. Des systèmes de ciblage en deux et trois temps sont en développement pour limiter ces inconvénients.

III-1-3-2. Méthodes de préciblage

Ces méthodes consistent à administrer dans un premier temps un anticorps non radiomarké possédant, en plus de son ou ses sites de fixation à l'antigène, un ou plusieurs sites de fixation pour une petite molécule qui sera radiomarkée et injectée dans un second temps. Cette seconde injection intervient au moment où le taux d'anticorps circulant est le plus bas et le taux d'anticorps fixé à la tumeur le plus élevé. Cette molécule de petite taille diffuse alors rapidement vers l'anticorps (et donc la tumeur sur laquelle il est fixé), et la fraction non fixée est éliminée rapidement de l'organisme ce qui permet de minimiser la dose reçue par les tissus sains.

Deux principales approches ont été envisagées. La première repose sur la très forte affinité de la biotine (vitamine B8) pour l'avidine, une protéine que l'on trouve dans le blanc d'œuf, ou pour la streptavidine, une protéine produite par la bactérie *Streptomyces avidinii* ($K_a \approx 10^{15} \text{ M}^{-1}$, l'une des plus fortes interactions non covalentes connues). Elle consiste à injecter un anticorps couplé à de la (strept)avidine dans un premier temps, puis la biotine radiomarkée. A l'inverse, la biotine peut également être couplée à l'anticorps et c'est dans ce cas la (strept)avidine qui est radiomarkée et injectée dans la deuxième étape. De plus, la tétravalence de l'avidine et de la streptavidine vis-à-vis de la biotine permet d'accroître la quantité de biotine radiomarkée sur l'anticorps. Une autre méthode basée sur le même principe (strept)avidine/biotine a plus récemment été développée et se déroule en trois étapes. La première consiste à injecter l'anticorps couplé à la biotine, puis la (strept)avidine est administrée. Elle se fixe sur la biotine de l'anticorps et permet l'élimination de l'anticorps circulant résiduel. Dans une troisième étape la biotine radiomarkée est injectée et se fixe rapidement sur le complexe anticorps-biotine/(strept)avidine (Figure 6). Des études, poussées jusqu'à des essais cliniques de phase I/II ont montré des résultats prometteurs dans le traitement des gliomes avec de la biotine radiomarkée à l'Yttrium-90⁸.

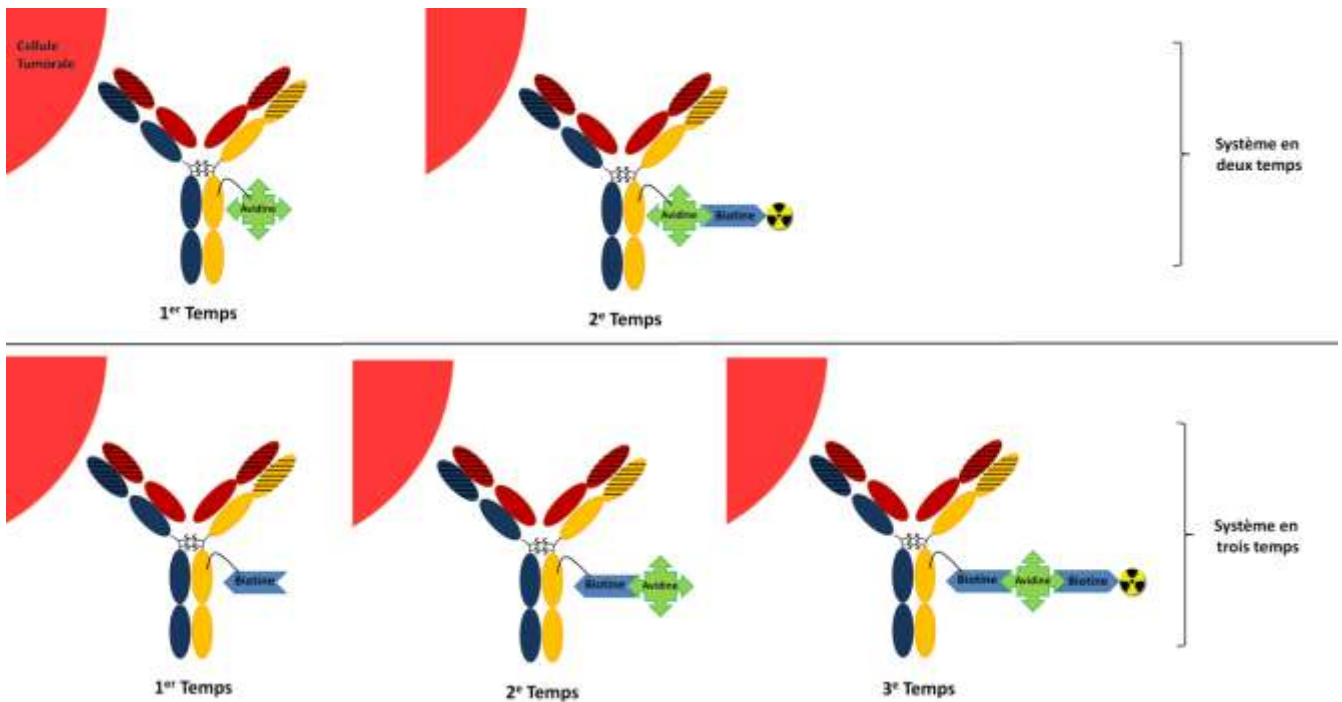


Figure 6 : principe des systèmes (strep)avidine/biotine en deux temps et trois temps.

Une méthode alternative de préciblage appelée AES (Affinity Enhancement System) consiste à injecter dans un premier temps un anticorps bispécifique obtenu par recombinaison de fragments ou par génie génétique. Cet anticorps est constitué de deux régions variables distinctes, l'une spécifique de l'antigène tumoral, l'autre de l'haptène radiomarqué qui est injecté dans un second temps⁹. L'utilisation d'haptènes bivalents permet la formation de complexes à la stabilité accrue en se fixant à deux anticorps présents sur des antigènes proches sur la cellule tumorale (Figure 7). Des résultats prometteurs ont été obtenus avec ce système, tant pour le diagnostic avec l'obtention d'images au contraste accru, que pour la thérapie¹⁰.

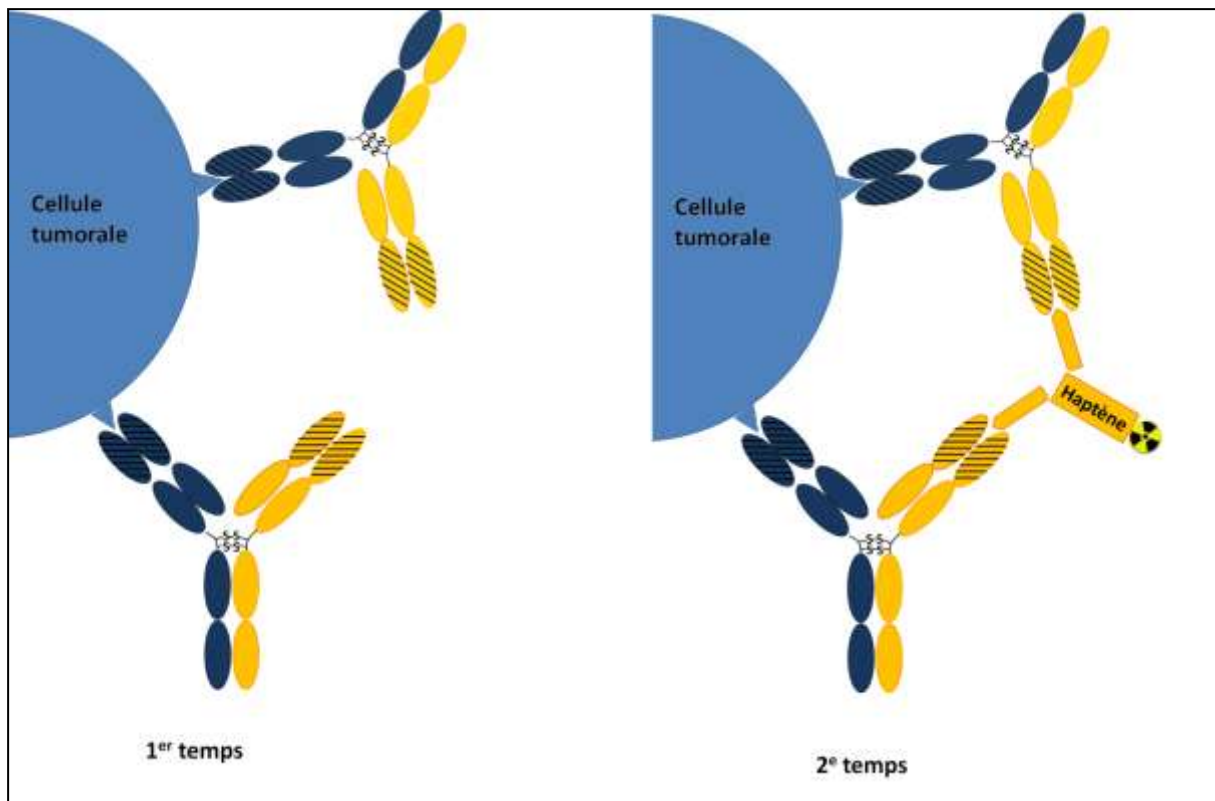


Figure 7 : principe du précipilage AES.

L'apport de l'ingénierie des anticorps permet aujourd'hui l'accès à des formes multivalentes d'anticorps donnant accès à des affinités améliorées (ex : tribody possédant deux sites de reconnaissance pour l'antigène ciblé et un site de reconnaissance de l'haptène)¹¹.

III-2. Méthodes de radiomarquage des anticorps

Les anticorps étant constitués d'enchainements d'un grand nombre d'acides aminés, ils possèdent de nombreux sites réactifs permettant l'introduction des radionucléides. Pour les radioisotopes de l'iode, il est possible de réaliser des substitutions électrophiles aromatiques directement sur les tyrosines de l'anticorps. Toutefois, pour les autres éléments d'intérêt qui sont principalement des métaux et d'autres halogènes, la fixation directe sur les anticorps n'est pas réalisable. Il est donc nécessaire de passer par l'intermédiaire d'une molécule possédant deux sites réactifs, l'un permettant la fixation du radionucléide (cage chélatante pour les métaux ou noyau aromatique activé pour les halogènes), l'autre capable de former une liaison avec un des sites réactifs de l'anticorps qui sont principalement de type amine, et thiol, ou d'autres fonctions introduites chimiquement (Tableau 1).

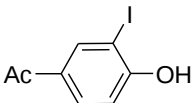
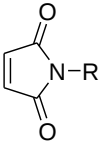
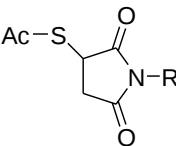
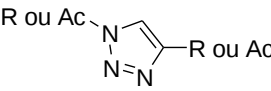
Fonction sur l'anticorps (Ac)	Fonction sur l'agent chélatant ou le synthon	Liaison formée
 Ac-Tyrosine	I ⁺ seul (oxydation de NaI)	
Ac-NH ₂ (principalement issus des lysines)	Anhydride Bromoacétamide Ester activé isothiocyanate	Ac-NH-CO-R Ac-NH-CH ₂ -CO-R Ac-NH-CO-R Ac-NH-CS-NH-R
Ac-SH (obtenu par réduction des ponts disulfures ou par modification des NH ₂)	 Maléimide	
Ac—≡ (obtenu par modification sur les NH ₂ ou les SH)	N ₃ -R	
Ac-N ₃ (obtenu par modification sur les NH ₂ ou les SH)	≡-R	

Tableau 1 : fonctions de couplages des anticorps les plus utilisées.

De nombreux agents chélatants ont été conçus pour la complexation de la grande variété de cations métalliques utiles pour la radiopharmacie. Porteurs d'une fonction de couplage aux anticorps, ils sont désignés par le terme « agents chélatants bifonctionnels » ou BCA (Figure 8). Ces molécules possèdent dans leur structure des hétéroatomes porteurs de doublets susceptibles de se coordonner au métal. Il s'agit dans de nombreux cas de macrohétérocycles (favorisés par rapports aux formes acycliques pour des raisons de stabilité) dont la taille doit être adaptée au rayon ionique du cation considéré. Les hétéroatomes sont choisis selon la théorie HSAB (Hard and Soft Acids and Bases) de Pearson décrivant l'affinité des acides durs pour les bases dures et des acides mous pour les bases molles^a.

^a Rappel : sont considérés comme acides durs les atomes accepteurs d'électrons peu polarisables, peu électronégatifs et difficilement réductibles. Ils sont de petite taille et porteurs d'une charge positive élevée (ex : les alcalins et alcalino-terreux tels que Li⁺, Na⁺, Be²⁺ ou Ca²⁺, les cations des éléments de transition dans leurs degrés d'oxydation élevé tels que Ti⁴⁺, Cr⁶⁺ et les cations métalliques en d⁰ tels que Fe³⁺ ou Co³⁺). Ils s'associent fortement aux bases dures, atomes de petite taille, donneurs d'électron, et peu polarisables tels que RNH₂, RO⁻ ou RCOO⁻. Les acides mous sont à l'inverse de grosse taille, peu chargés et très polarisables (métaux de transition dans leur état d'oxydation inférieur tels que Ag⁺, Pd²⁺, Ir³⁺). Ils s'associent préférentiellement aux bases molles aux atomes volumineux, peu électronégatifs et très polarisables tels que R₃P, R₂S, RS⁻).

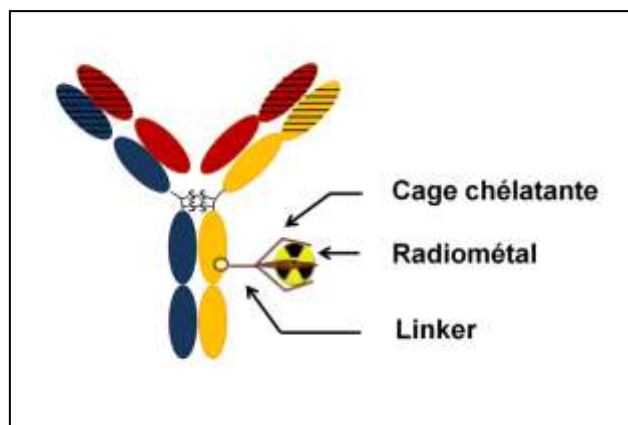


Figure 8 : schéma simplifié d'un BCA complexé à un radiométal et couplé à un anticorps.

Ces chélatants doivent être capables de former un complexe de bonne inertie cinétique pour éviter la dissociation du cation *in vivo* conduisant et l'accumulation dans certains organes non ciblés et à de l'irradiation non spécifique. Dans le cadre de la radioimmunothérapie, le challenge est d'autant plus important en raison de la grande dilution du BCA et de la présence de cations (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+}) en grande concentration dans l'organisme, susceptibles d'être en compétition et de s'échanger avec le radiométal d'intérêt. Certains chélatants naturels de l'organisme peuvent également conduire à une dissociation du métal de son vecteur par transchélation (ex : la transferrine, chélatant naturel du fer produite au niveau du foie). La nature du BCA (notamment sa lipophilie, sa charge globale et sa taille) peut également avoir une influence sur la biodistribution de l'anticorps et sur son immunoréactivité (sa capacité à reconnaître l'antigène et à s'y lier). La nature du linker entre la cage chélatante et l'anticorps peut participer à un ajustement de ces caractéristiques. La Figure 9 présente quelques structures d'intérêt pour médecine nucléaire.

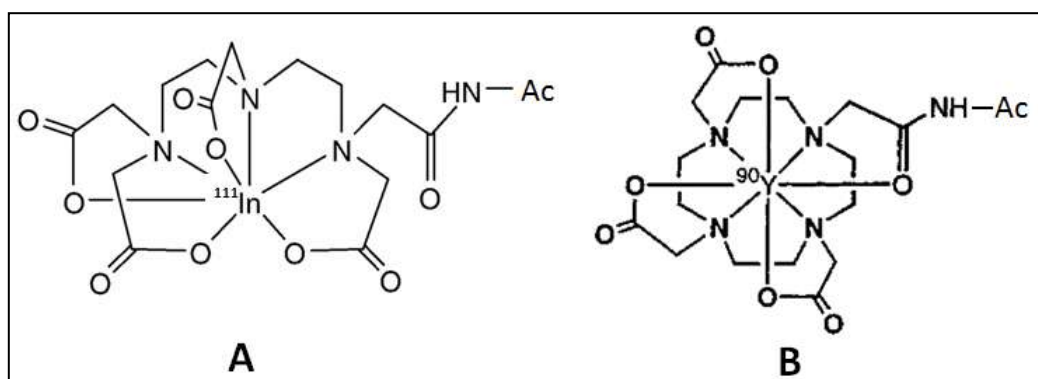


Figure 9 : Indium-111 chélaté par l'EDTA en (A) et Yttrium-90 complexé au DO3A en (B).

Dans le cas des non-métaux d'intérêt pour le ciblage immunologique, des précurseurs permettant la formation d'une liaison covalente avec le radionucléide sont

nécessaires. Pour les halogènes, qui sont les plus utilisés, des méthodes de substitution sur des noyaux aromatiques sont généralement employées (décrites plus en détail pour l'astate en page 40).

Deux procédures de radiomarquage sont applicables pour les anticorps (Figure 10). La première, appelée marquage direct consiste à coupler le BCA ou le synthon à l'anticorps avant radiomarquage. La fixation du radionucléide s'effectue alors directement sur l'anticorps modifié. Lorsque les conditions nécessaires sont trop dures pour permettre un radiomarquage direct (température élevée, pH ou solvants organiques, susceptibles d'altérer l'anticorps), la méthode de marquage indirect est employée. Elle consiste à fixer le radionucléide sur le BCA ou le synthon avant couplage à l'anticorps. Cette méthode présente l'inconvénient d'être plus longue à réaliser et ne sera pas adaptée pour les radioisotopes de trop courte demi-vie.

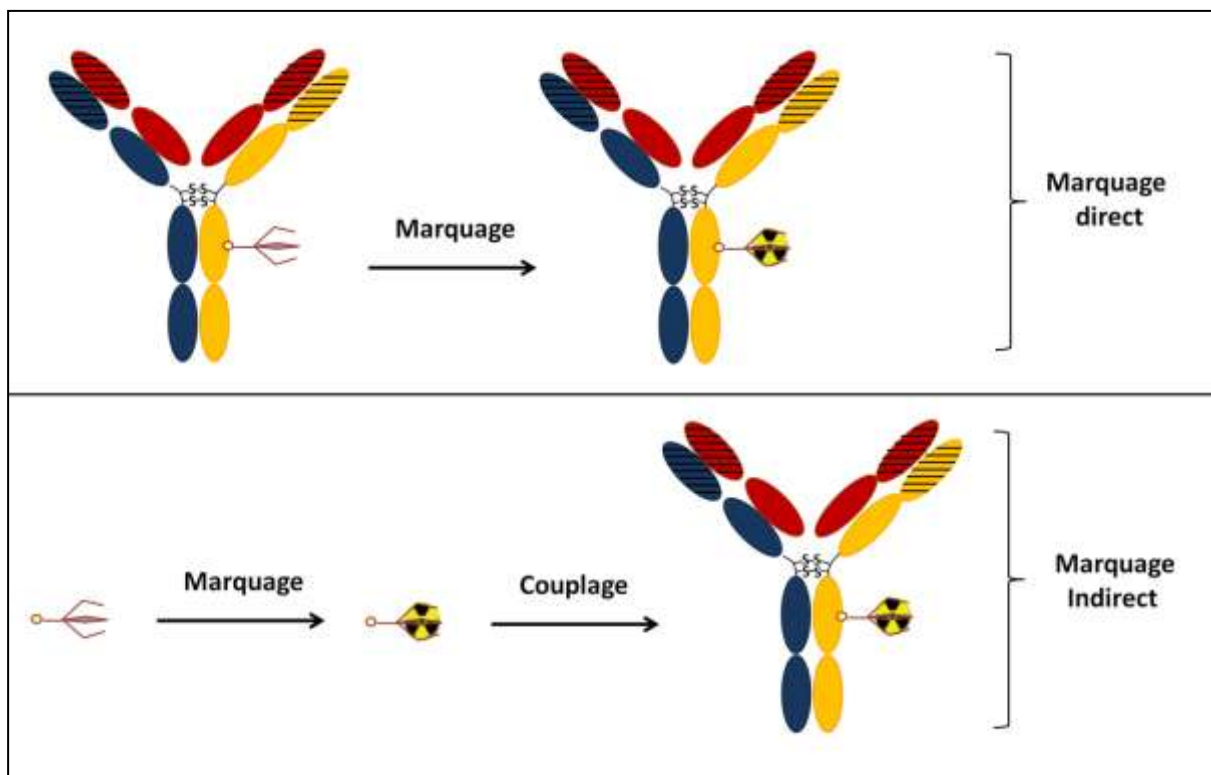


Figure 10 : méthodes directe et indirecte de marquage des anticorps.

III-3. Le radionucléide

Le choix d'un radionucléide en médecine nucléaire dépend tout d'abord de l'application souhaitée. Selon le type de rayonnement émis pendant sa désintégration, l'utilisation sera à visée diagnostique ou thérapeutique. La demi-vie du radionucléide est un

critère primordial, celle-ci devant être suffisamment longue pour couvrir le temps de préparation du radiopharmaceutique et le temps nécessaire au ciblage de la tumeur (dépendant du vecteur). Elle ne doit pas non plus être trop longue pour éviter l'irradiation sur le long terme des tissus sains. La nature de l'isotope fils sera également un critère de sélection important, l'idéal étant qu'il s'agisse d'un isotope stable. La disponibilité du radioisotope sera importante pour pouvoir développer des applications de routine et les propriétés chimiques seront déterminantes pour le couplage aux vecteurs d'intérêt. Peu de radionucléides répondent à tous ces critères, mais plusieurs s'approchent des caractéristiques idéales pour des applications bien précises.

III-3-1. Les radionucléides utiles en imagerie

Pour être exploitables en imagerie, les rayonnements radioactifs doivent être très pénétrants dans les tissus pour être détectables depuis l'extérieur du patient et peu ionisants pour limiter les dégâts causés aux tissus traversés. Ce sont les rayonnements gamma et bêta plus qui répondent à ces critères.

III-3-1-1. Les émetteurs gamma

Les rayonnements gamma sont des ondes électromagnétiques de courte longueur d'onde émis lors de la désexcitation des atomes radioactifs. Leur énergie est très variable (de quelques keV à plusieurs MeV) et des matériaux très denses tels que le plomb sont nécessaires pour les atténuer. Les émetteurs gamma de faible énergie (< 400 keV) ont permis le développement de l'imagerie (Tableau 2), notamment suite au développement des gamma-caméras (ou caméras à scintillation). Cette technique d'imagerie appelée scintigraphie permet l'obtention d'images en deux dimensions. Plus récente, la technique SPECT (single photon emission computed tomography) combine les images obtenues dans plusieurs angles d'incidence par rotation d'une gamma-caméra autour du patient pour former une image tridimensionnelle.

Radionucléide	Demi-vie	E _{max} (keV)
Technétium-99m	6 h	140
Indium-111	67,2 h	171, 245
Iode-123	13,2 h	159
Iode-131	8 jours	284, 364, 637

Tableau 2 : émetteurs gamma d'intérêt pour l'immunoscintigraphie.

Le technétium-99m est aujourd'hui de loin le radioisotope le plus utilisé en imagerie gamma (80 % des utilisations en scintigraphie) en raison de ses excellentes caractéristiques physiques¹². L'iode-131 est utilisé en thérapie pour ses rayonnements β^- , mais ses composantes γ permettent d'effectuer simultanément de l'imagerie. Si l'iode-123 est intéressant sous forme d'iodure pour la visualisation de la thyroïde ou sous forme de MIBG (méta-iodobenzylguanidine) pour le diagnostic des ganglioneuroblastomes chez l'enfant, son utilisation est aujourd'hui limitée par son coût très élevé. L'indium-111 possède quant à lui deux émissions gamma intéressantes, il sera privilégié pour l'obtention d'images tardives en raison de sa demi-vie relativement longue.

Aujourd'hui, l'association d'émetteurs gamma à des anticorps pour des applications en immunoscintigraphie reste limitée à des utilisations ponctuelles. Quelques anticorps radiomarqués qui avaient reçus une autorisation de mise sur le marché dans les années 90 tels que l'Oncoscint® (anticorps murin radiomarqué à l'indium-111 pour le diagnostic des récidives des cancers colorectaux et ovariens¹³) ou le CEA-Scan® (fragment Fab' murin anti-ACE radiomarqué au technétium-99m pour le diagnostic des récidives des cancers colorectaux¹⁴) ne sont plus utilisés aujourd'hui. La raison principale est la concurrence des méthodes par rayons X, scanner et IRM. L'utilisation d'émetteurs bêta plus, plus spécifiques et plus sensibles et dont la technologie nécessaire à leur emploi est moins coûteuse est en pleine explosion.

III-3-1-2. Les émetteurs bêta plus

Les particules β^+ (ou positons), sont les antiparticules des électrons (même masse et même spin mais charge opposée). Une fois expulsé du noyau lors de la désintégration, le positon s'annihile avec un électron libre ou faiblement lié rencontré sur son parcours pour générer deux photons gamma de 511 keV de directions opposées. Ces photons sont détectés par une couronne de détection, l'incidence simultanée par deux photons permettant de localiser la source de l'émission pour donner une image. Cette technique d'imagerie est appelée tomographie par émission de positon (ou TEP, principe en Figure 11). Bien que plus délicate à mettre en œuvre, notamment pour l'acquisition des données, cette technique se montre plus sensible que l'imagerie SPECT.

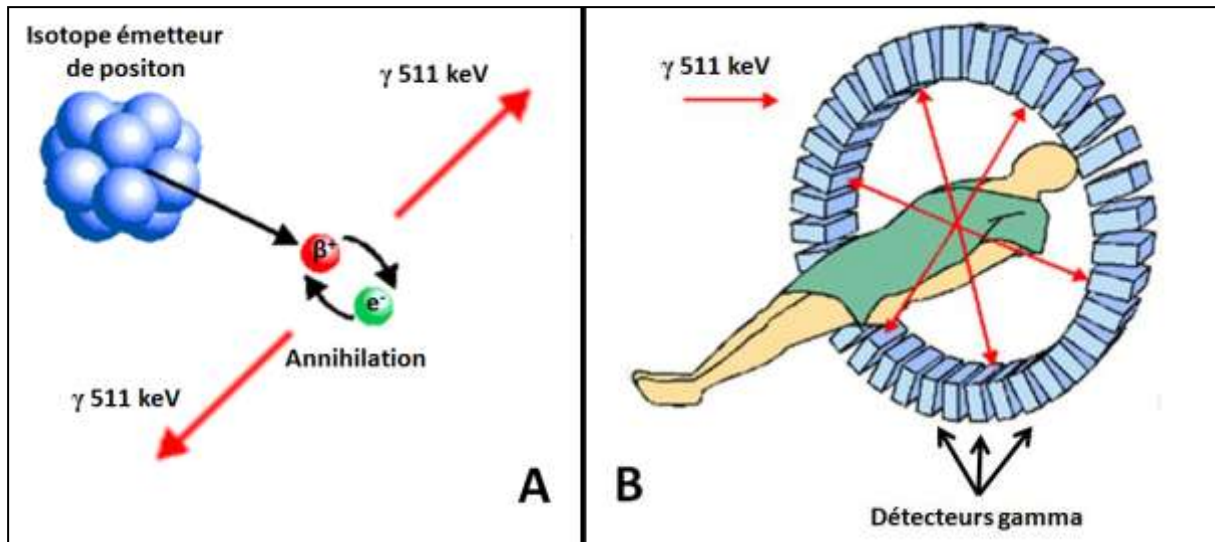


Figure 11 : Principe de l'imagerie TEP. En (A), après avoir parcouru une certaine distance dans la matière et perdu son énergie, la particule β^+ s'annihile avec un électron pour former deux rayons gamma de directions opposées. La distance parcourue avant annihilation dépend de l'énergie du positon et donc de l'isotope employé. Le choix de l'isotope aura donc une influence sur la résolution en imagerie. En (B), La couronne de détection placée autour du patient est constituée de nombreux détecteurs. La coïncidence simultanée de deux détecteurs colinéaires permet de localiser la source du rayonnement.

Plusieurs isotopes de courte demi-vie ont montré des applications potentielles (Tableau 3), en particulier le fluor-18 qui, associé au glucose sous forme de [^{18}F]-fluorodéoxyglucose (FDG), permet la visualisation des zones surconsommatrices de glucose (cas d'une grande partie des cancers). Le FDG est aujourd'hui très largement utilisé en médecine nucléaire¹⁵ (environ 90 % des analyses par TEP) et le fluor-18 fait l'objet de nombreuses recherches, facilitées par sa grande disponibilité en raison de l'implantation de nombreux cyclotrons dédiés à la préparation de ce radioisotope dans les centres de médecine nucléaire. En raison de la demi-vie plus courte du carbone-11, son utilisation est plus limitée, le transport hors des services capables de le produire inadapté. Associé à divers composés, le carbone-11 a toutefois trouvé des applications intéressantes avec la visualisation de tumeurs variées sous différentes formes telles que la [^{11}C]-méthionine¹⁶ ou la [^{11}C]-choline¹⁷.

L'immuno-TEP (association d'un anticorps à un émetteur bêta) pourrait permettre le diagnostic pour des cancers ne répondant pas au FDG tels que le cancer de la prostate. Pour cela, des isotopes de demi-vies plus longues et adaptées au temps de circulation des anticorps sont activement étudiés. L'iode-124 et le zirconium-89 font ainsi l'objet d'un intérêt grandissant étant donné leurs caractéristiques favorables^{18,19}. En raison de sa demi-vie plus courte, le gallium-68 pourrait quant à lui trouver des applications dans le cadre de vectorisation préciblée²⁰.

Radionucléide	Demi-vie	E _{max} (keV)
Fluor-18	1,83 h	633
Carbone-11	20,4 min	960
Azote-13	9,97 min	1199
Oxygène-15	2,07 min	1732
Gallium-68	68 min	1899
Iode-124	4,18 jours	812, 1535, 2138
Zirconium-89	3,27 jours	902
Cuivre-64	12,7 h	653

Tableau 3 : émetteurs d'intérêt pour l'imagerie PET.

III-3-2. Les radionucléides utilisables en thérapie.

Pour être utilisable en thérapie, le radionucléide doit émettre des rayonnements d'énergie élevée pour détruire les cellules cibles. Toutefois ces rayonnements doivent être peu pénétrants et être vectorisés avec une biodistribution favorable pour limiter les dégâts causés aux tissus sains traversés. Les particules bêta moins et alpha ainsi que les électrons Auger présentent ces caractéristiques.

III-3-2-1. Les émetteurs bêta moins.

Les particules bêta moins sont des particules de même masse et de même charge que les électrons. Ils pénètrent assez peu dans la matière (quelques centaines de micromètres à plusieurs millimètres) et sont stoppés par quelques millimètres de matériaux peu denses tels que le plexiglas. Leur énergie élevée permet une radiolyse conséquente de l'eau des cellules traversées et la génération d'espèces oxydantes délétères, ainsi que des cassures des brins d'ADN conduisant à la destruction des cellules. En raison d'un dépôt d'énergie sur plusieurs millimètres, leur utilisation n'est pas adaptée aux tumeurs de plus petites tailles puisque la plus grande partie de l'énergie serait déposée à l'extérieur des cellules ciblées. Les particules β^- sont émises au départ selon une trajectoire rectiligne et deviennent plus ionisantes lorsqu'elles sont ralenties en fin de parcours. En raison de leur faible masse, elles sont déviées par collisions successives selon des angles aléatoires conduisant à un dépôt d'énergie plus important à distance (Figure 12).



Figure 12 : Trajet d'une particule bêta. L'énergie déposée est plus importante en fin de parcours.

Les émetteurs bêta conviennent donc mieux aux tumeurs de plus grosses tailles. De plus, la relativement grande pénétration des rayonnements β^- permet l'irradiation à distance. Le phénomène dit de « feu croisé » permet ainsi d'atteindre des cellules d'un amas cellulaire sur lesquelles aucun anticorps ne s'est fixé. Des cellules situées au centre d'une tumeur et peu accessibles à l'anticorps ou n'exprimant pas l'antigène cible peuvent ainsi être également détruites (Figure 13).

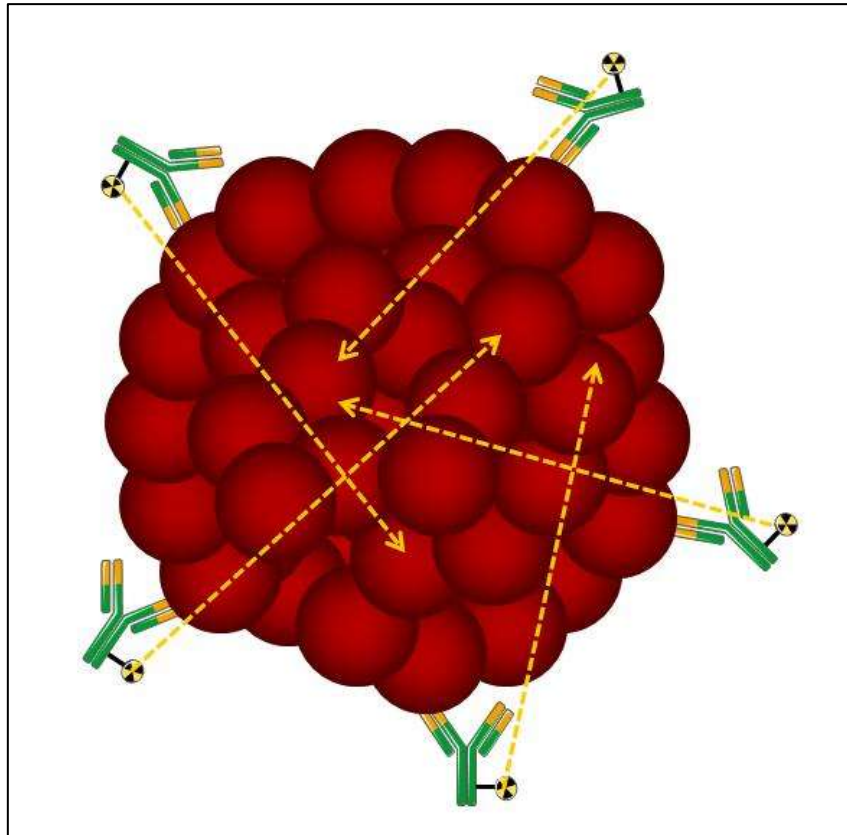


Figure 13 : phénomène de feux croisés sur un amas cancéreux.

Le choix de l'émetteur bêta se fait en fonction du type de tumeur à traiter, l'énergie du rayonnement et le vecteur associé devant être bien adaptés (Tableau 4). La radioimmunothérapie bêta a aujourd'hui fait ses preuves et plusieurs radiopharmaceutiques basés sur cette méthode ont reçu des autorisations de mise sur le marché et sont actuellement utilisés en clinique. C'est le cas du Zevalin®, association d'un anticorps ciblant l'antigène CD20 (exprimé par les cellules de lymphome) et marqué à l'yttrium-90 ayant reçu une autorisation de mise sur le marché européenne en 2004 pour le traitement des lymphomes non hodgkiniens. Le Bexxar®, autorisé aux Etats Unis depuis 2003 pour le même type de traitement est un anticorps anti-CD20 associé à de l'iode-131²¹.

Radionucléide	Demi-vie	Parcours maximum (mm)	$E_{\max} \beta^-$ (keV)
Iode-131	8 jours	2,9	610
Yttrium-90	2,7 jours	11	2250
Rhénium-188	17 h	10	2120
Cuivre-67	2,46 jours	1,8	181 à 577
Lutétium-177	6,7 jours	2	498

Tableau 4 : émetteurs β^- aux propriétés intéressantes pour la radioimmunothérapie.

Si les émetteurs bêta ont aujourd'hui fait preuve de leur efficacité et du potentiel de la radioimmunothérapie, l'utilisation d'émetteurs alpha pourraient combler le manque dans l'arsenal thérapeutique du traitement des plus petites tumeurs.

III-3-2-2. Les émetteurs alpha

Les particules alpha sont des noyaux d'hélium. Ils sont très énergétiques (4 à 10 MeV) et très peu pénétrants (40 à 100 μm soit 2 à 5 cellules) ce qui leur confère une très grande efficacité pour la destruction des cellules isolées ou des tumeurs de petites tailles tout en limitant l'irradiation des tissus sains environnants (Figure 14). En association avec des vecteurs adaptés, les émetteurs alpha devraient donc trouver des applications dans le traitement des microtumeurs disséminées (micrométastases, cancers résiduels après chirurgie, etc.).

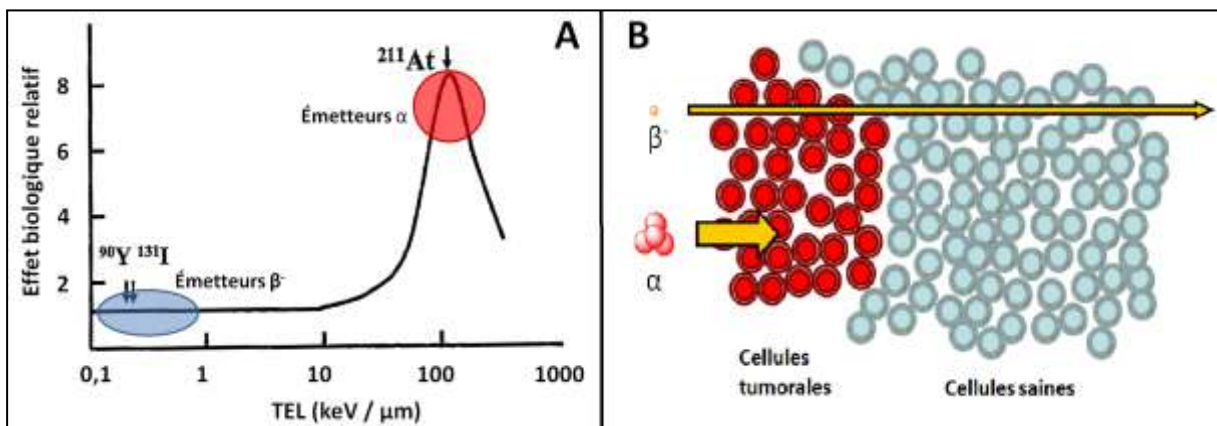


Figure 14 : comparaison alpha/bêta. En (A), le TEL^b élevé des émetteurs alpha rendent leur efficacité biologique largement supérieure aux émetteurs bêta. En (B), les particules alpha sont peu pénétrantes et très ionisantes rendant possible la destruction de petits amas tumoraux tout en préservant les tissus sains.

Sur la centaine d'émetteurs alpha connus, très peu possèdent des propriétés exploitables en médecine nucléaire (Tableau 5). La plupart d'entre eux ne dépasse

^b Le TEL (transfert d'énergie linéique) est la quantité d'énergie déposée par un rayonnement par unité de longueur. Il est d'environ 100 keV/ μm pour les émetteurs alpha et de 0,2 keV / μm pour les émetteurs bêta.

cependant pas plus de quelques heures de demi-vie, impliquant la nécessité de méthodologies de radiomarquage rapides et l'utilisation de vecteurs à la cinétique adaptée à ces temps relativement courts. Le bismuth-213 et l'astate-211 sont les deux à avoir été le plus étudiés. Le bismuth-213 a permis la démonstration de l'efficacité de la radioimmunothérapie alpha sur des modèles cellulaires²² et animaux²³ et a récemment fait l'objet d'essais cliniques²⁴. En raison de sa demi-vie plus adaptée, l'astate-211 semble le plus prometteur à l'heure actuelle pour le développement de ce type d'application. Des problèmes de stabilité des radiomarquages avec ce radioisotope restent toutefois à résoudre (aspect abordé plus en détail dans le chapitre III, page 29).

L'actinium-225, de demi-vie plus longue, a également fait l'objet de plusieurs études. Les quatre particules α issues de sa décroissance (28 MeV au total) permettraient théoriquement une efficacité décuplée par rapport aux autres émetteurs α . Pour être réalisable, la vectorisation de ce radionucléide nécessite la séquestration de l'actinium-225 mais aussi de ses radionucléides fils pour les conserver au contact de la tumeur. Un challenge important est à relever pour le chimiste, une cage chélatante devant être conçue pour résister à l'énergie de recul dégagée lors des désintégrations pour éviter le relarguage des radionucléides fils observé avec les composés utilisés jusqu'à présent²⁵. Elle doit également être capable de complexer de façon stable les isotopes issus des désintégrations successives pour maintenir les émissions α depuis l'anticorps.

Une approche similaire et plus abordable dans un premier temps semble être le développement de générateurs *in vivo* de plomb-212/bismuth-212. Dans ce système, le plomb-212, de 10,2 h de demi-vie, se désintègre par émission β^- en Bi-212, émetteur α , allongeant ainsi artificiellement la demi-vie du Bi-212. Toutefois, l'utilisation du DOTA, un chélatant de bonne stabilité à la fois pour le plomb et le bismuth, ne donne pas de très bons résultats avec une forte proportion de désintégrations effectives du Bi-212 ayant lieu en dehors du chélatant²⁶.

Une solution alternative pourrait être l'utilisation de liposomes ou de nanocapsules permettant la rétention des nucléides fils du plomb-212 et de l'actinium-225 s'ils se révèlent assez résistants à la radiolyse importante pouvant être causée par des l'émissions alpha successives.

Radionucléide	Demi-vie	E α (MeV)
Terbium-149	4 h	4,0
Astate-211	7,2 h	5,9 – 7,5
Bismuth-212	60,6 min	6,1 – 7,8
Plomb-212	10,2 h	Voir bismuth-212
Bismuth-213	45,6 min	8,4
Radium-223	11,4 jours	5,1-5,8
Actinium-225	10,0 jours	5,1-5,8 + fils

Tableau 5 : isotopes d'intérêt pour la radioimmunothérapie alpha.

III-3-2-3. Les émetteurs d'électrons Auger

Les électrons Auger sont issus de la désintégration du radionucléide par capture électronique (CE) ou par conversion interne (CI)^c. Les électrons Auger présentent un TEL élevé sur les premiers micromètres avant de rejoindre le comportement des particules β^- de faible énergie. De nombreux radionucléides tels que l'iode-125 ou l'indium-111, utilisés pour leur rayonnement gamma en imagerie, sont également des émetteurs d'électrons Auger. En raison de la très courte distance d'irradiation des électrons Auger, leur utilité n'est envisageable que si le radionucléide peut être placé au plus près de l'ADN pour détruire les cellules cancéreuses. L'utilisation d'anticorps internalisables dans les cellules dans des essais de phase clinique a déjà été réalisée et pourrait permettre l'utilisation de ce type d'émetteur dans le cadre de la radioimmunothérapie²⁷.

^c La capture électronique correspond à la capture d'un électron périphérique de l'atome par son noyau. Cet électron est absorbé par un proton du noyau pour former un neutron. Lors d'une conversion interne, l'énergie en excès du noyau est transmise à un électron périphérique qui est alors expulsé de l'atome. Dans les deux cas, le cortège se réarrange alors avec émission de rayon X ou d'un électron Auger

IV. L'astate-211, radionucléide prometteur pour la radioimmunothérapie alpha des cancers.

IV-1. Caractéristiques de l'astate-211 et production

L'existence de l'élément au numéro atomique $Z=85$ est démontrée pour la première fois en 1940 par Corson lorsqu'il irradie du bismuth-209 par un faisceau de particules alpha accélérées à 32 MeV ²⁸. Prévu par Mendeleïev en dessous de l'iode (nommé alors eka-iode), cet élément est le seul halogène à ne pas présenter d'isotopes stables. Ses découvreurs décident donc de le nommer astate, du grec $\acute{\alpha}\sigma\tau\alpha\tau\omicron\varsigma$ (astatos = instable).

L'astate est présent sur Terre en de très faibles quantités (estimées à quelques milligrammes pour l'ensemble de la croûte terrestre) ce qui en fait l'élément naturel le plus rare²⁹. Il est issu de certaines branches de désintégration de l'uranium-235, de l'uranium-238 et du Thorium-232. 32 isotopes de l'astate sont aujourd'hui connus : ^{191}At et ^{193}At à ^{223}At . Leurs demi-vies vont de 125 ns pour l'astate-213 à 8,1 h pour l'astate-210. Il s'agit pour la majorité d'entre eux d'émetteurs de particules alpha (Tableau 6).

Parmi ces nombreux isotopes, seul l'astate-211 présente des caractéristiques physiques adaptées à des applications en radiothérapie.

IV-1-1. Propriétés physiques de l'astate-211

L'astate-211 se désintègre avec une période de demi-vie de 7,21 heures selon un schéma de décroissance à deux branches. Une première branche conduit directement au bismuth-207 par émission d'une particule alpha. Le bismuth-207 de 33,9 ans de demi-vie conduit au plomb-207 par capture électronique. La seconde branche de désintégration se fait par capture électronique et conduit au polonium-211 de 516 ms de demi-vie qui décroît à son tour par émission d'une particule alpha pour former du plomb-207 stable (Figure 15).

Tableau 6 : isotopes identifiés de l'astate.

Isotope	Demi-vie	Type d'émission
¹⁹¹ At	1,7 ms	α (100 %)
¹⁹³ At	28 ms	α (100 %)
¹⁹⁴ At	40 ms	α (n.d. %) ; ϵ (n.d. %)
¹⁹⁵ At	328 ms	α (100 %)
¹⁹⁶ At	388 ms	α (95,1 %) ; ϵ (4,9 %)
¹⁹⁷ At	388 ms	α (96,1 %) ; ϵ (3,9 %)
¹⁹⁸ At	4,2 ms	α (90 %) ; ϵ (10 %)
¹⁹⁹ At	7, 03 s	α (90 %) ; ϵ (10 %)
²⁰⁰ At	43 s	α (52 %) ; ϵ (48 %)
²⁰¹ At	85,2 s	α (71 %) ; ϵ (29 %)
²⁰² At	184 s	α (37 %) ; ϵ (63 %)
²⁰³ At	7,4 min	α (31 %) ; ϵ (69 %)
²⁰⁴ At	9,2 min	α (3,8 %) ; ϵ (96,2 %)
²⁰⁵ At	26,9 min	α (10 %) ; ϵ (90 %)
²⁰⁶ At	30,6 min	α (0,9 %) ; ϵ (99,1 %)
²⁰⁷ At	1,8 h	α (8,6 %) ; ϵ (91,4 %)
²⁰⁸ At	1,63 h	α (0,6 %) ; ϵ (99,4 %)
²⁰⁹ At	5,41 h	α (4,1 %) ; ϵ (95,9 %)
²¹⁰ At	8,1 h	α (0,2 %) ; ϵ (99,8 %)
²¹¹ At	7,2 h	α (41,8 %) ; ϵ (58,2 %)
²¹² At	314 ms	α (100 %)
²¹³ At	125 ns	α (100 %)
²¹⁴ At	558 ns	α (100 %)
²¹⁵ At	0,1 ms	α (100 %)
²¹⁶ At	0,3 ms	α (99,9 %)
²¹⁷ At	32,3 ms	α (99,9 %) ; ϵ (0,1 %)
²¹⁸ At	1,5 s	α (99,9 %) ; β^- (0,1 %)
²¹⁹ At	56 s	α (97 %) ; β^- (3 %)
²²⁰ At	3,71 min	α (8 %) ; β^- (92 %)
²²¹ At	2,3 min	β^- (100 %)
²²² At	54 s	β^- (100 %)
²²³ At	50 s	β^- (100 %)

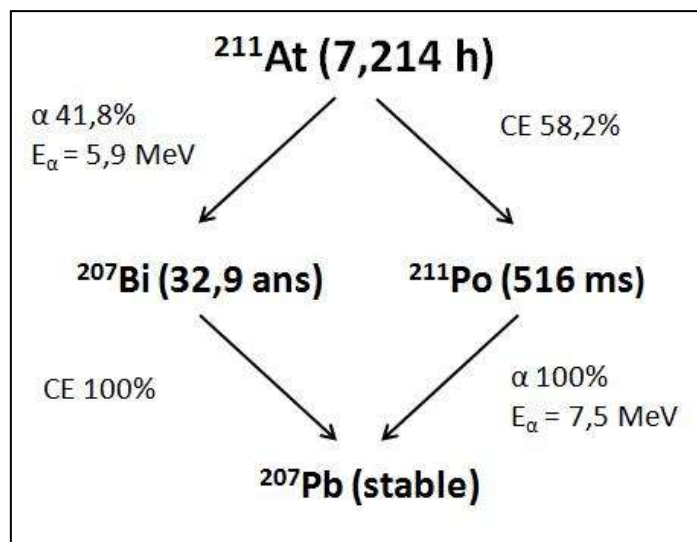


Figure 15 : schéma simplifié de décroissance de l'astate-211.

Chaque désintégration d'astate conduit donc à l'émission d'une particule alpha de 5,87 MeV (42 %) ou 7,45 MeV (58 %). On peut s'interroger sur le devenir de la particule alpha issue de la désintégration du polonium-211 dans le cadre de la radiothérapie vectorisée. Le polonium peut en effet diffuser dans les tissus puisque détaché du vecteur auquel était fixé l'astate-211³⁰. Toutefois, en raison de sa très courte demi-vie, la majorité des émissions alpha du polonium-211 sont supposées intervenir dans l'environnement proche de formation du radionucléide. En raison de sa longue demi-vie, le bismuth-207 ne pose pas non plus de problème malgré son accumulation dans le foie et les reins, 37 MBq d'astate-211 initiaux ne conduisant qu'à la formation de 0,033 MBq de ce radioisotope.

Une propriété intéressante de l'astate-211 d'un point de vue pratique est l'émission de rayons X lors de la désintégration en polonium-211. Avec des énergies comprises entre 77 et 92 KeV, ces rayons X peuvent être mesurés avec des détecteurs gamma classiquement utilisés en laboratoire ou en clinique pour mesurer des activités ou encore faire du suivi *in vivo* par imagerie SPECT³¹.

IV-1-2. Production de l'astate-211

L'astate-211 est obtenu en cyclotron par irradiation de bismuth naturel (²⁰⁹Bi) par bombardement de particules alpha (bien que d'autres méthodes beaucoup plus anecdotiques aient été développées^{32,33}) selon la réaction nucléaire suivante:

L'obtention d'astate-211 est possible pour des énergies de faisceau alpha allant de 21 MeV à plus de 40 MeV, avec une section efficace^d maximale de production observée pour une valeur de 31 MeV. Cependant, à partir de cette valeur, on commence aussi à observer la formation non négligeable d'astate-210. Cet isotope présente des caractéristiques non compatibles avec une application pharmaceutique puisqu'il décroît en polonium-210 potentiellement toxique pour la moelle osseuse et de demi-vie longue (138,2 ans)³⁴. On observe également la formation de polonium-210 à partir de 26,7 MeV. Ceci pose moins de problème puisque les méthodes d'extraction de l'astate avant utilisation permettent d'éliminer la présence de ce contaminant³⁵ (Figure 16). Pour ces raisons, l'énergie d'irradiation employée est généralement d'environ 28 MeV. Cette valeur permet de s'affranchir totalement de la présence d'astate-210 tout en préservant un bon rendement de production. Toutefois, très peu de cyclotrons dans le monde sont capables d'accélérer des particules alpha à des énergies supérieures à 25 MeV, ce qui rend l'accès limité à ce radionucléide.

Une autre limitation à prendre en compte est le bas point de fusion du bismuth et sa faible conductivité thermique ($7,9 \text{ W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$) ainsi que la haute volatilité de l'astate qui peut provoquer des pertes d'activité à cause de l'échauffement pendant l'irradiation. Des rendements de production maximum de 400MBq/ μA peuvent être obtenus en utilisant une fine couche de bismuth déposée sur un support de bonne conductivité thermique refroidi à

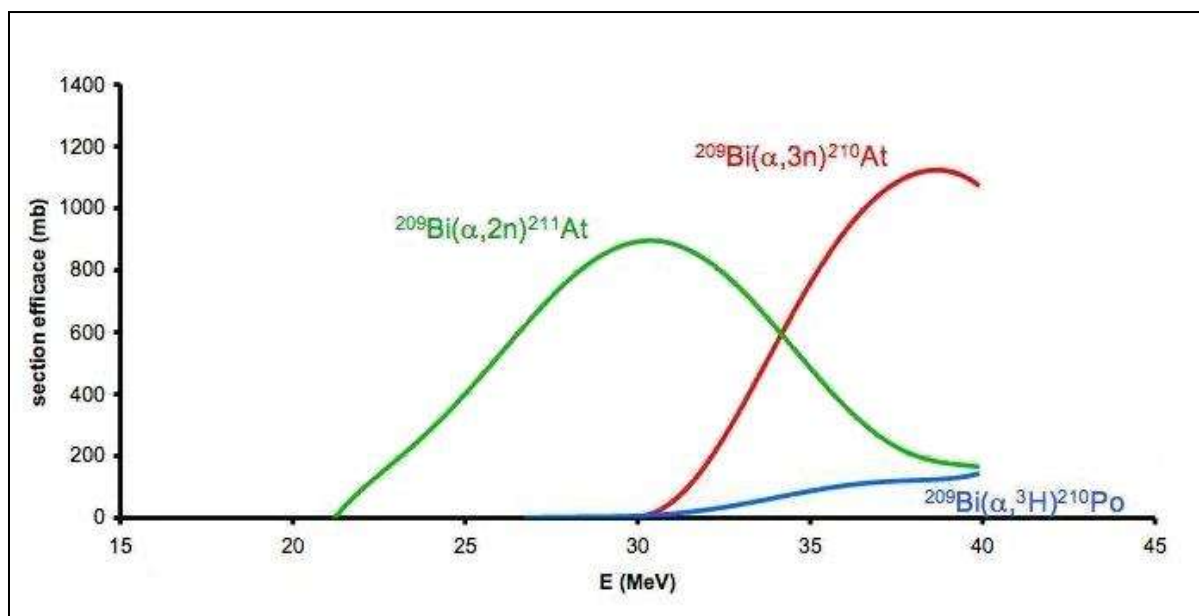


Figure 16 : sections efficaces de production de l'astate-210, de l'astate-211 et du polonium-210.

^d La section efficace représente la probabilité d'une interaction entre la particule accélérée et les particules du matériau ciblé. Elle s'exprime en millibarns (mb).

l'eau durant l'irradiation. La plupart des supports de cible utilisés sont des plaques d'aluminium ($250 \text{ W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$) sur lesquelles le bismuth est déposé en une fine couche. Moins courants, des supports en cuivre ($390 \text{ W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$) ont aussi été utilisés.

IV-1-3. Purification de l'astate-211

Après irradiation, la cible est constituée de bismuth et de polonium en plus de l'astate qu'il convient d'obtenir avec la plus grande pureté possible. Deux méthodes sont décrites pour isoler l'astate-211 : la sublimation, qui est la plus couramment utilisée, et l'extraction liquide/liquide après attaque acide de la cible.

- Purification par distillation sèche :

Cette technique consiste à placer la cible dans un four chauffé à une température supérieure au point d'ébullition de l'astate (337°C). Les points d'ébullition du bismuth et du polonium étant de 1564°C et 962°C respectivement, la température du four est fixée à une température de 650°C à 900°C . Durant la distillation, tandis que le bismuth et le polonium fondus restent sur le support, l'astate est emporté par un flux d'azote et recondensé en sortie de four (Figure 17) :

- soit directement par barbotage dans le solvant choisi. La solution d'astate est ensuite prélevée et utilisée telle quelle. Pour optimiser le temps de manipulation, des systèmes où l'astate est condensé directement dans une solution contenant l'ensemble des réactifs nécessaires au marquage ont été développés³⁶.

-soit dans un tube en PEEK (PolyEtherEtherKetone) immergé dans un bain refroidi à la carboglace. L'astate condensé dans le tube est alors dissous dans le solvant nécessaire à la suite des opérations³⁷.

Avec ces deux méthodes, l'astate est obtenu en une trentaine de minutes en solution aqueuse (généralement sulfite de sodium ou hydroxyde de sodium) ou dans un solvant organique (généralement méthanol ou chloroforme) avec des rendements d'environ 80%.

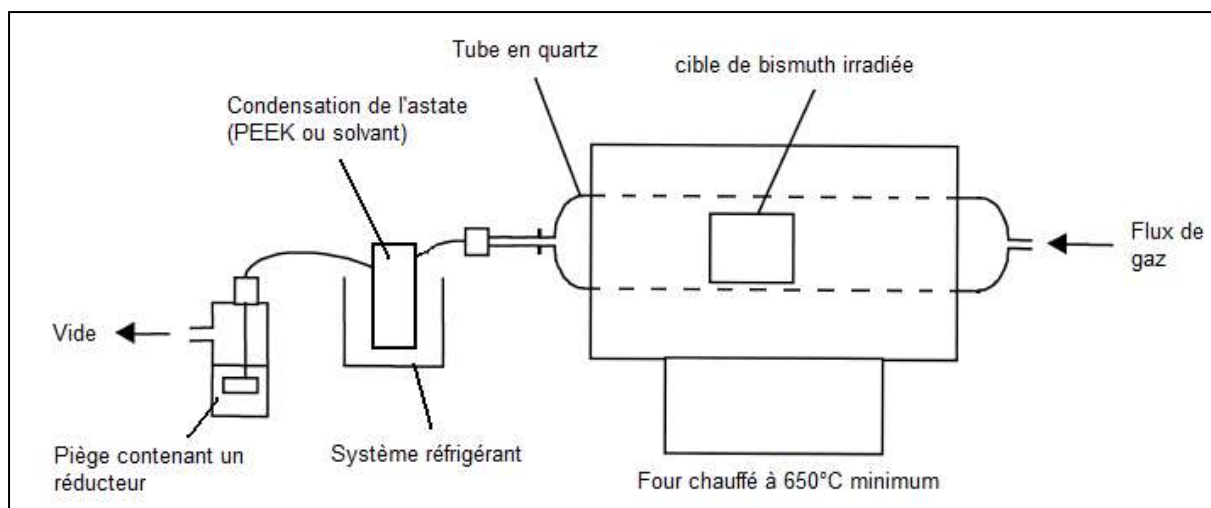


Figure 17 : schéma simplifié d'un montage de sublimation de l'astate-211.

- Purification par extraction liquide/liquide :

Cette méthode consiste à attaquer la cible avec une solution d'acide nitrique concentrée. Après évaporation de l'acide nitrique, le résidu sec contenant le bismuth et l'astate est dissous dans de l'acide nitrique dilué et l'astate extrait par de l'éther diisopropylique³⁸. L'astate est obtenu en 1h15 avec de bons rendements (environ 90%), une bonne reproductibilité et une très bonne pureté radionucléidique. Cependant, des limites d'utilisation apparaissent puisque l'activité est obtenue en éther diisopropylique ou en éther butylique uniquement, les autres solvants testés ne permettant pas une extraction avec un rendement et une pureté satisfaisants. De plus, une quantité importante d'acide nitrique passe en phase organique lors de l'extraction, ce qui peut perturber certaines réactions³⁹.

Lors des radiomarquages effectués lors de ce travail de thèse, ces deux méthodes d'extraction ont été utilisées et les aspects techniques seront abordés plus en détail dans la partie expérimentale.

IV-2. Propriétés chimiques de l'astate

Malgré plus de 70 ans de recherche, la chimie de l'astate n'est aujourd'hui pas encore complètement établie. La principale raison est le fait qu'aucun isotope stable de cet élément n'existe. L'isotope le plus stable ayant une demi-vie de 8,1 h, les plus fortes activités produites correspondent à seulement quelques nanogrammes (la plus grosse activité produite répertoriée et de 6,59GBq soit 0,087 μ g³⁶), bien loin des quantités nécessaires aux méthodes d'analyse usuelles telles que la RMN, la spectrométrie de masse ou aux techniques de spectroscopie UV, IR ou RX. De plus, aux concentrations obtenues, l'astate

en solution est présent à l'état de traces et sera en compétition avec les impuretés du milieu souvent bien plus concentrées que le radioélément d'intérêt lors des différentes réactions mises en jeu.

La recherche sur l'astate reste de plus un domaine assez confidentiel car très peu d'accélérateurs possèdent les caractéristiques nécessaires à la production de ce radioélément. L'accès à celui-ci reste donc limité à quelques laboratoires privilégiés. La mise en place de plusieurs nouveaux cyclotrons dédiés, dont ARRONAX près de Nantes⁴⁰, devrait permettre un essor de la recherche sur l'astate dans les années à venir.

Malgré ces différents obstacles, de nombreuses propriétés de l'astate ont pu être déduites par analogie avec l'iode, son homologue halogéné le plus proche. Toutefois, l'astate sous ses formes oxydées montre de nombreuses propriétés propres aux métaux. Comparable à l'argent sous forme At^+ , il est proche du comportement du polonium dans ses formes d'oxydation supérieures.

IV-2-1. Les états d'oxydation de l'astate⁴¹⁻⁴³

Six états d'oxydation de l'astate ont pu être identifiés avec plus ou moins de certitudes. Il s'agit des états $-I$, 0 , $+I$, $+III$, $+V$ et $+VII$. Aux faibles concentrations d'astate mises en jeu dans les conditions opératoires (de 10^{-11} à 10^{-15} M), les diverses techniques d'analyses employées font appel à la chimie des traces. Les méthodes de coprécipitation, d'extraction liquide/liquide ou d'électromigration associées aux connaissances de la chimie de l'iode, ont permis d'établir plusieurs caractéristiques de ces différents états d'oxydation en milieu aqueux.

At(-I) : L'état d'oxydation ($-I$) est sans doute la forme d'astate la mieux définie. Obtenue en milieu réducteur tels que SO_3^{2-} , Zn^0 ou la cystéine, la forme At^- (caractérisée par électromigration à l'anode ou coprécipitation avec AgI par exemple) est stable sur une large gamme de pH. L'anion astature a un comportement de base molle, tout comme l'iodure.

At(0) : l'état d'oxydation 0 fait référence aux composés ne montrant pas de mobilité dans un champ électrique. C'est la forme obtenue lors de la distillation de la cible de bismuth après production. Cette forme n'a jamais pu être clairement identifiée. Les formes At_2 ou At sont supposées très improbables car, aux concentrations considérées, elles sont trop réactives envers les impuretés du milieu. Leur existence est donc très éphémère. Ainsi l'astate se retrouve recombinaison sous forme AtX ($X = HSO_4$, NO_3 , OAc , etc...dépendant du milieu d'extraction de l'astate).

At(+I) : obtenu en présence d'oxydants modérés (HClO_4 / $\text{H}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ dilués) sous forme At^+ en milieu acide ou AtO^- en milieu alcalin. Sous forme cationique, l'astate présente un caractère d'électrophile relativement faible, similairement à l'iode. Il aura toutefois un comportement semblable à certains métaux avec des formes cationiques stables face à l'hydrolyse en milieu acide contrairement aux autres halogènes :



Notée $\text{At}(\theta)^+$ cette forme cationique de l'astate possède un caractère d'acide plutôt mou et présente une affinité prononcée pour les ligands de type bases molles (I^- , CN^- , SCN^- , thioethers ...), similairement à Ag^+ .

At(+III) : obtenue dans des conditions plus oxydantes ($\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$, H_2O_2), cette forme est difficilement isolable et est généralement présente en mélange avec At^+ dont le ratio dépend des conditions opératoires. Il a été obtenu sous forme anionique (AtOX_2^- , AtX_4^-), neutre (XAtO , $\text{At}(\text{OH})_3$, $\text{At}(\text{OH})\text{X}_2$, AtX_3) ou cationique (AtSO_4^+ , AtCrO_4^+). Cette forme d'astate aura un comportement proche d' At^+ avec toutefois un caractère d'acide plus dur et s'associant donc plutôt à des bases plutôt dures telles que Cl^- , NO_3^- ou SO_4^{2-} .

At(+V) : obtenu sous conditions très oxydantes uniquement (Ce^{IV} , NaBiO_3 , $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ ou IO_4^- à chaud) sous forme AtO_3^- , caractérisé par coprécipitation avec AgIO_3 ou $\text{Ba}(\text{IO}_3)_2$.

At(+VII) : anecdotique, sa préparation est décrite en NaOH chaud en présence de fluorure de xénon pour former l'anion perastatate AtO_4^- .

Récemment le diagramme de Pourbaix de l'astate en milieu aqueux a pu être proposé en combinant une approche expérimentale à une approche par calculs théoriques (Figure 18). Il met en évidence l'existence des formes $-I$, $+I$ et $+III$ de l'astate dans le domaine de stabilité de l'eau.

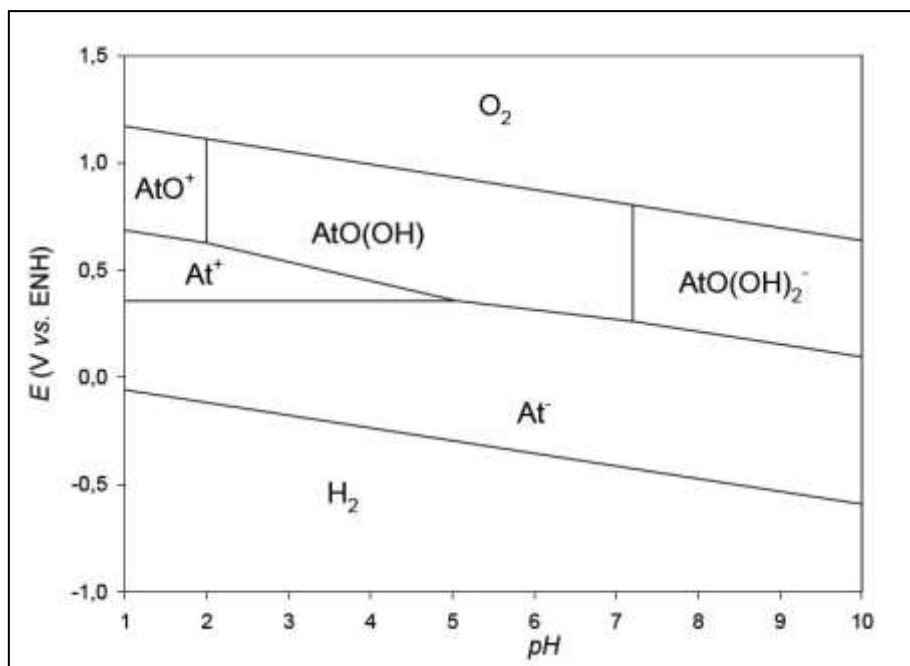


Figure 18 : Diagramme de Pourbaix de l'astate en milieu aqueux non complexant⁴⁴.

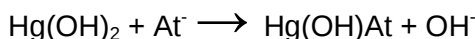
Dans tous les cas, une incertitude subsiste pour les formes d'astate présentées dans ces pages (à différents degrés selon les espèces) et quelques contradictions peuvent apparaître dans la littérature. L'astate est qualifié d'élément au comportement caméléon⁴⁵, de très faibles variations opératoires pouvant causer des problèmes de reproductibilité des résultats. Ces problèmes de reproductibilité ont particulièrement été observés et en partie expliqués pour les formes oxydées de l'astate qui peuvent être stabilisées en contrôlant précisément les anions présent dans le milieu. Une évolution de l'état d'oxydation de l'astate au cours du temps dans des solutions concentrées peut également être observée. Les rayonnements alpha hautement énergétiques de l'astate génèrent des peroxydes dans le milieu qui, à haute dose, permettent l'oxydation de l'astate, le faisant passer de l'état (-I) à des états d'oxydation positifs. Des travaux récents montrent également qu'en milieu méthanolique, l'astate sous forme (+I) peut être réduit sous forme (-I) sous l'effet de la radiolyse⁴⁶. Ce sont dans ce cas l'hydrogène et le formaldéhyde issus de la dégradation du méthanol qui sont les espèces réductrices du milieu.

IV-2-2. Complexation de l'astate

Dans le but d'obtenir des radiomarquages stables avec les formes ioniques de l'astate pour des applications *in vivo*, sa complexation a été étudiée sous les deux formes suivantes :

L'anion At⁻ : l'astature ayant tout comme l'iodure un comportement de base molle selon la théorie HSAB, on peut s'attendre à ce qu'il forme des complexes stables avec les

métaux de transition formant des cations mous tels que Hg^{2+} , Rh^{3+} ou Ir^{3+} . Ainsi, en solution aqueuse et en présence de nitrate de mercure, on peut observer la formation de ce type de complexe :



Ce complexe se révèle plus stable que ceux formés par les iodures⁴⁷. Des complexes chargés obtenus selon le même principe ont pu être formés avec du rhodium ou de l'iridium et chélatés dans des structures macrocycliques soufrées (Figure 19). Ils montrent une bonne stabilité chimique *in vitro* (tampon phosphate, pH = 7,4) et pourraient trouver des applications en thérapie alpha s'ils se révèlent suffisamment stables *in vivo*⁴⁸.

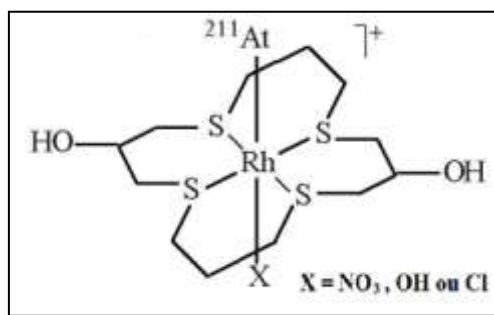


Figure 19: complexe $^{211}\text{At-Rh(16-S4-diol)}$.

Le cation At^+ : il a été beaucoup plus étudié qu' At^- et avec des ligands variés. La complexation avec des halogénures a permis dans un premier temps de mettre en évidence un caractère d'acide plutôt mou puisque la stabilité des complexes augmente selon la séquence suivante⁴⁹ :



De stabilité inférieure à celle d' AtI_2^- , plusieurs pseudo-halogènes tels que SCN^- , N_3^- ou $\text{C}(\text{CN}_3)^-$ ont également été évalués⁵⁰.

L'étude de nombreux ligands soufrés et sélénisés avec des dérivés de type thiourée ou sélénourée a permis de mettre en évidence une stabilité supérieure à AtI_2^- avec de meilleurs résultats pour les sélénourées^{51,52}. Ces complexes sont de forme $\text{At}(\text{thiourée})_2^+$ ou $\text{At}(\text{sélénourée})_2^+$ (Figure 20).

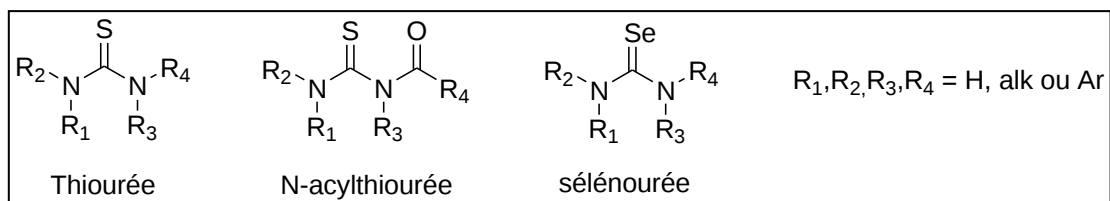


Figure 20 : Structures de ligands soufrés et sélénés impliqués dans la formation de complexes de type AtL_2^+ .

Le caractère métallique de l'astate (+I) a été clairement confirmé avec la complexation d' At^+ par des chélatants tels que l'EDTA⁵³, le DTPA⁵⁴ ou le NTA⁵⁵ couramment utilisés pour les métaux (Figure 21).

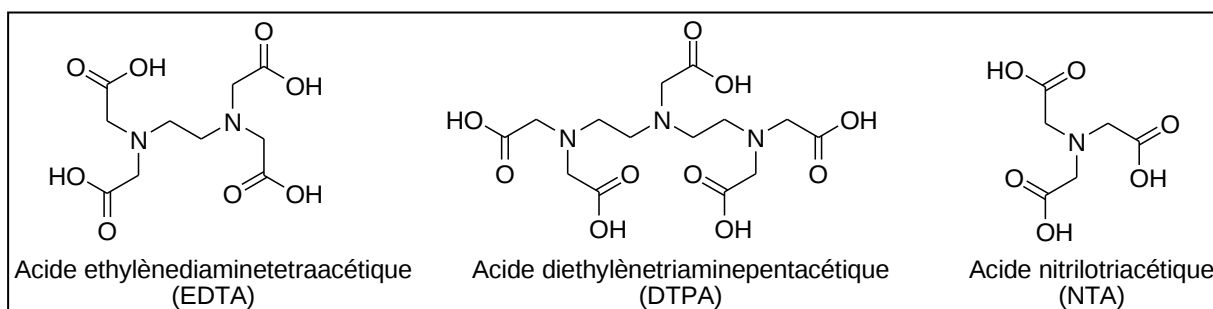


Figure 21 : structures de l'EDTA, du DTPA et du NTA.

La faisabilité du radiomarquage d'un anticorps à l'astate-211 complexé au DTPA a pu être démontrée, mais la faible stabilité *in vivo* observée ne permet pas une application biomédicale⁵⁶. Si la preuve du concept a pu être faite, ce type de ligand semble mal adapté puisque porteur d'atomes donneurs durs uniquement (oxygène et azote).

La possibilité de complexation avec des ligands phosphorés plus mous a également été mise en évidence⁵⁷. Cependant leur utilisation semble improbable en raison de leur pouvoir réducteur intrinsèque conduisant à la réduction de l'astate en At^- pour des pH supérieurs à 2. La solution la plus réaliste semble donc l'utilisation de ligands de type thioéther qui se révèlent supérieurs à leurs analogues azotés⁵⁸. Le développement d'éthers couronnes porteurs de soufres adaptés à la taille du cation At^+ (122 pm) devraient ainsi permettre d'obtenir de meilleures stabilités indispensables à des applications biologiques (exemple en Figure 22).

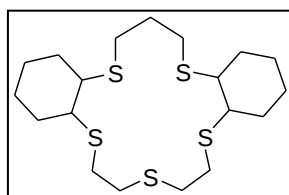


Figure 22 : exemple d'une structure 16-crown-5 soufrée potentiellement intéressante pour la chélation d' At^+ .

Les états d'oxydation supérieurs At³⁺/At⁵⁺: En raison de leur caractère d'acide plus dur qu'At⁺, les formes At³⁺ et At⁵⁺ sembleraient plutôt adaptées à la formation de complexes avec des ligands durs porteurs d'oxygène et/ou d'azote. Toutefois, ces deux espèces n'ont à ce jour pas fait l'objet d'études de complexation.

IV-2-3. Chimie de covalence de l'astate

L'étude de la chimie inorganique de l'astate a permis de mettre en évidence des propriétés propres aux halogènes mais aussi des propriétés propres aux métaux. La chimie organique de l'astate fait quand à elle intervenir uniquement les propriétés des halogènes et en particulier de l'iode pour concevoir des biomolécules d'intérêt radiomarquées. Comme pour l'iode, la liaison covalente entre l'halogène et la biomolécule se fait exclusivement sur un atome de carbone, à l'exception de l'intérêt récent pour la liaison astate-bore, et ce pour des raisons de stabilité chimique.

IV-2-3-1. La liaison carbone-astate

L'énergie de la liaison entre l'halogène et le carbone est un facteur important quant au devenir *in vivo* de la biomolécule radiomarquée. Dans la série des halogènes, plus celui-ci est lourd, plus l'énergie de liaison C-X est faible, avec toutefois des valeurs plus élevées pour les halogénoaryles que pour les halogénoalkyles (Tableau 7). C'est pourquoi le radiomarquage de biomolécules peut s'opérer indifféremment sur des structures alkyles ou aryles pour le fluor, le chlore ou le brome, alors que dans le cas de l'iode et *a fortiori* de l'astate, la liaison est généralement faite avec un carbone aromatique pour limiter la libération d'halogène *in vivo*.

X	Phényle-X	Alkyle-X
H	460	398
F	523	444
Cl	398	339
Br	335	285
I	268	222 ± 12
At	197 ± 20	163 ± 12

Tableau 7: Energies des liaisons phényle et alkyle-halogène (kJ/mol)⁵⁹.

Les réactions mises en jeu sont donc similaires à celles employées pour les radiomarquages à l'iode et le plus souvent optimisées pour l'astate-211 qui impose l'utilisation de procédures les plus rapides possibles en raison de sa courte demi-vie. Elles sont basées sur l'utilisation de l'astate nucléophile (At⁻ obtenu en phase aqueuse en présence d'un réducteur tel que Na₂SO₃) ou électrophile (At⁺ obtenu en phase aqueuse ou organique en présence d'un oxydant tel que H₂O₂ ou la N-chlorosuccinimide).

- **Echange halogène/astate** : l'astate réduit sous forme At^- peut être employé pour réaliser des substitutions nucléophiles sur des dérivés halogénés. En raison de la faiblesse de la liaison $\text{C}_{\text{alkyl}}\text{-At}$, la substitution sur les alkyles a été très peu étudiée. Elle se fait généralement à partir d'un dérivé iodé en raison du caractère nucléofuge plus marqué de l'iode dans la série des halogènes.

Plus courante, la substitution nucléophile aromatique se fait principalement à partir de dérivés iodés avec lesquels la réaction sera facilitée, mais les bromoaryles peuvent être avantageusement utilisés puisqu'ils sont plus facilement séparables du produit astaté par chromatographie en raison d'une plus grande différence de polarité.

Les avantages de cette méthode sont la rapidité de la réaction et les bons rendements obtenus. En revanche, en raison des températures élevées nécessaires, cette méthode se limite à des substrats résistants à des conditions plutôt dures. L'utilisation de catalyseurs tels que des éthers couronnes, pour augmenter la nucléophilie de l'halogène, ou de cuivre (I) permettent toutefois de favoriser ce type de réaction. Quelques exemples sont présentés dans le Tableau 8.

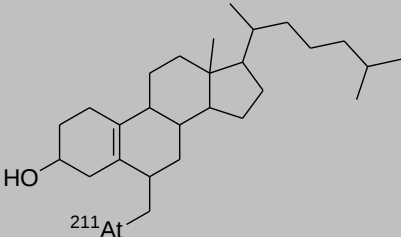
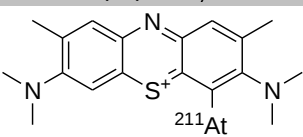
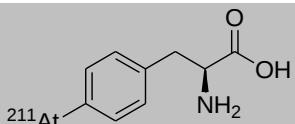
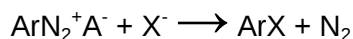
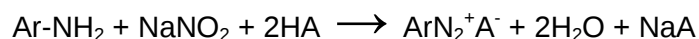
Composé	Conditions/remarques	rendement	ref
 6-[^{211}At]-astatomethyl-19-norcholest-5(10)-en-3 β -ol	Obtenu à partir du dérivé iodé en présence d'éthers couronnes en 10 min à 70°C. Purification sur CCM préparative, ne permet pas l'élimination du produit de départ de même Rf.	80%	60
 Astature du bleu de méthylène	Obtenu à partir du dérivé iodé en présence d'un éther couronne 5min à 80°C	71±16%	61
 4-[^{211}At]-astato-L-phenylalanine	Obtenu à partir du dérivé iodé en 60min à 120°C en présence de Cu^+	67-80%	62

Tableau 8: exemples de composés obtenus par transhalogénéation.

- **Dédiazonation** : les sels de diazonium sont largement utilisés pour la fonctionnalisation de noyaux aromatiques. Générés en présence d'acide nitreux à partir

d'une amine aromatique, ils permettent l'introduction d'halogénures par chauffage et libération d'azote.



En synthèse organique classique, ce type de réaction est réalisé en présence d'un excès d'halogénure pour limiter la réaction concurrente due à l'eau présente dans le milieu et conduisant à la formation de phénol et à de nombreux autres sous-produits.

Etant donné les concentrations très faibles d'astate mises en jeu lors de ce type de réaction, il paraît *a priori* peu probable d'obtenir de bons rendements par cette méthode en raison des nombreuses réactions parasites pouvant devenir prédominantes. Pourtant, alors que les essais de mise au point à partir de traces d'iode radioactif donnent de faibles rendements (15% maximum), de bien meilleurs résultats peuvent être observés avec l'astate sur des composés équivalents (jusqu'à 90%). Cette différence de réactivité peut être expliquée par le mécanisme de dédiazonation mis en jeu. Deux modes de clivage de la liaison C-N peuvent en effet intervenir. Il s'agit soit d'un clivage hétérolytique conduisant à la formation d'un cation aryle, soit d'un clivage homolytique conduisant à la formation d'un radical aryle (Figure 23).

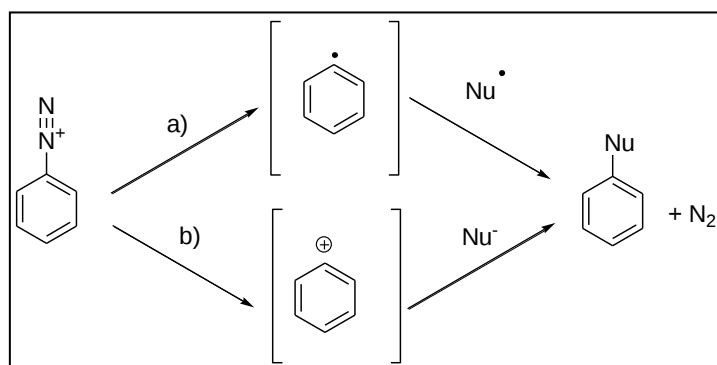
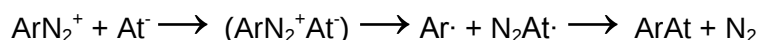


Figure 23 : mécanisme de dédiazonation. a) clivage homolytique. b) clivage hétérolytique.

La voie du clivage homolytique semble la plus probable. En effet, l'anion astature, plus polarisable que l'iodure est plus susceptible de former un complexe stable avec le diazonium. Pour les mêmes raisons de polarisabilité, l'astate aura une plus grande tendance que l'iode à céder un électron pour former un radical dans une deuxième étape pour se recombiner avec le radical aryle⁶³.



Les radiomarquages à l'astate-211 par cette méthode sont toutefois très peu utilisés puisque l'étape préliminaire de formation du sel de diazonium requiert des conditions oxydantes et un pH bas limitant les substrats utilisables et conduisant à un mélange de nombreux sous produits, souvent sous forme précipitée, compliquant la purification.

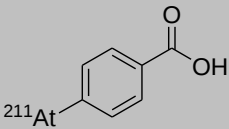
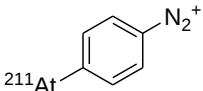
Composé	Conditions/remarques	rendement	ref
 acide 4-[211At]-astatobenzoïque	Obtenu par chauffage à 50°C jusqu'à la fin du dégagement d'azote	70-85%	64
 4-[211At]-astatobenzènediazonium	Le bisdiazonium est mis en contact simultané de l'astate et d'une protéine 1h à 20°C. Le deuxième diazonium sert au couplage sur les tyrosines de la protéine	50-55% de protéine marquée	65

Tableau 9 : exemples de composés obtenus par dédiazotation

- **Substitution électrophile aromatique directe** : La substitution d'hydrogènes sur les noyaux aromatiques a été étudiée par plusieurs groupes afin de comprendre les mécanismes d'introduction de l'astate sur les protéines ou de mettre au point des méthodes de marquage permettant une séparation facile du précurseur sans faire intervenir de composés toxiques tels que les métaux lourds. Ainsi, il a pu être démontré que l'introduction d'At⁺ sur la tyrosine requerrait des conditions dénaturantes pour les protéines (température de 160°C en présence d'oxydant)⁶⁶ rendant impossible le marquage direct des anticorps sur leurs résidus tyrosine tel qu'il est pratiqué avec l'iode (aspect abordé plus en détail en page 47).

Très peu de composés d'intérêt biologique ont été obtenus par cette méthode en raison des conditions opératoires limitantes. L'exemple le plus intéressant est sans doute l'obtention de bleu de méthylène marqué à l'astate-211 (dirigé contre le mélanome)⁶⁷. Il est obtenu en 15 minutes à 100°C avec un rendement de 68%. L'activité spécifique est faible mais une purification chromatographique doit permettre la séparation du substrat de départ pour n'isoler que le composé radiomarké d'intérêt.

- **Démétallation** : La substitution électrophile d'At⁺ sur des précurseurs organométalliques est aujourd'hui le type de réaction le plus employé. Elle présente de nombreux avantages par rapport à la substitution électrophile directe sur les liaisons C_{ar}-H. En raison de la grande réactivité de la liaison carbone-métal ce type de composés permet des réactions rapides avec des rendements élevés dans des conditions douces et peut donc

être utilisé sur une grande variété de substrats. Les activités spécifiques obtenues peuvent de plus être très élevées.

Les organomercuriques sont les premiers à avoir été étudiés et s'ils permettent d'obtenir de bons rendements sur des composés variés^{68, 63}, la présence de mercure dans le milieu limite leur utilisation à des fins pharmaceutiques. Les métaux du groupe IV et en particulier le bore, le silicium et l'étain ont donc été préférés pour le radiomarquage avec des halogènes (Figure 24).

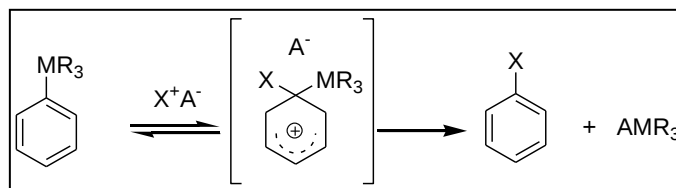


Figure 24 : mécanisme d'halodémétallation.

Les organostanniques sont les plus intéressants en raison de la plus grande faiblesse de la liaison C-M qui fait du groupement stannique un meilleur groupe partant (Tableau 10). Les précurseurs stanniques sont de plus généralement faciles d'accès par les méthodes de synthèse conventionnelle sur de nombreux types de composés.

Elément M	Electronégativité	Rayon covalent (Å)	Energie de liaison C-M (kJ/mol)	% ionique liaison C-M
H	2,20	0,37	418,8	2
B	2,01	0,79	372,7	6
Si	1,74	1,18	301,5	16
Sn	1,72	1,40	226,1	16
Hg	2,00	1,50	113,1	6

Tableau 10 : caractéristiques de liaisons carbone-métal (hydrogène inclu à titre comparatif).

Les organostanniques présentent toutefois une toxicité non négligeable et l'utilisation de précurseurs greffés sur support solide a été proposée pour simplifier la purification et limiter la présence de traces d'étain libéré pendant le marquage. La synthèse de la MABG a ainsi pu être réalisée avec des rendements corrects et une très haute pureté (< 1ppm d'étain en solution) en vue d'essais cliniques⁶⁹.

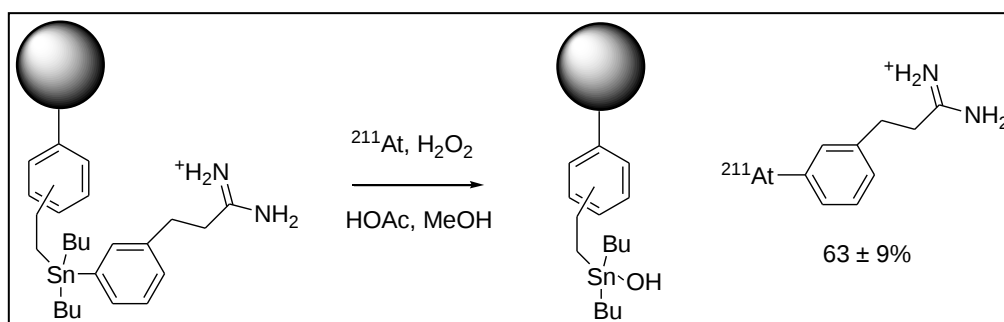


Figure 25 : Synthèse de la *meta*-[²¹¹At]-astatobenzylguanidine (MABG) à partir d'un dérivé stannique supporté.

Les organostanniques sont les composés les plus largement utilisés aujourd'hui pour l'introduction d'astate sur des biomolécules. Ils ont permis l'accès à de nombreux composés astatés dont l'astatobenzoate de N-succinimidyle (SAB), groupement prosthétique quasiment exclusivement utilisé lors du marquage de protéines. Les triméthylstannyles et les tributylstannyles sont les seules structures employées pour ce type de réaction. En raison de sa toxicité moindre, la forme tributylée semble préférable, d'autant plus que les différences de réactivité avec la forme triméthylée ne semblent pas significatives⁷⁰.

Composé	Conditions/remarques	rendement	ref
 4-tributylstannyl-N-piperidinoethylbenzamide	Marquage en éthanol/chloroforme/AcOH + chloramine T. 25 min à température ambiante.	74%	71
 5-(trimethylstannyl)-2'-deoxyuridine	Marquage en chloroforme/AcOH en présence d'H ₂ O ₂ . Ultrasons durant 15-20s	85-90%	72
 trialkylstannylbenzoate de N-succinimidyle	Marqués à l'astate-211 en chloroforme ou en méthanol en présence d'oxydants variés pour former le SAB. A permis le radiomarquage de nombreuses protéines	Jusqu'à 90% selon conditions	73

Tableau 11 : exemples de précurseurs organostanniques utilisés pour le marquage à l'astate-211.

IV-2-3-2. La liaison bore-astate.

En raison de la plus grande énergie de dissociation de la liaison B-I par rapport à C-I (381 ± 21 et 222 ± 12 kJ/mol respectivement) l'utilisation de précurseurs borés et en particulier de structures de type decaborate, dodecaborate ou carborane a été récemment envisagée pour obtenir des marquages stables de protéines à l'iode et à l'astate-211. Ces complexes constitués d'atomes de bore et éventuellement de carbone ont permis dans un premier temps le développement de la boroneurothérapie dont le principe est de soumettre un flux de neutrons thermiques à des atomes de bore au contact des cellules cancéreuses⁷⁴. Cette activation du bore permet de générer *in situ* des particules alpha selon la réaction nucléaire :

Un aspect intéressant de la chimie des carboranes est la réactivité orthogonale des atomes de bore et de carbone qui offre des possibilités de fonctionnalisation très variées. Alors que les CH sont des acides faibles (pKa de 22 à 27 selon la position) qui peuvent être déprotonés pour générer un nucléophile, les bores sont réactifs vis-à-vis des électrophiles et de nombreuses réactions propres aux carbones aromatiques sont applicables⁷⁵. Ces caractéristiques ont permis l'obtention de composés utiles pour le marquage de diverses structures à l'astate-211 (Figure 26) avec des temps très courts (1 à 10 minutes), de bons rendements (jusqu'à 90%) et une stabilité *in vivo* supérieure aux molécules marquées par l'intermédiaire d'une liaison C-At^{76, 77}.

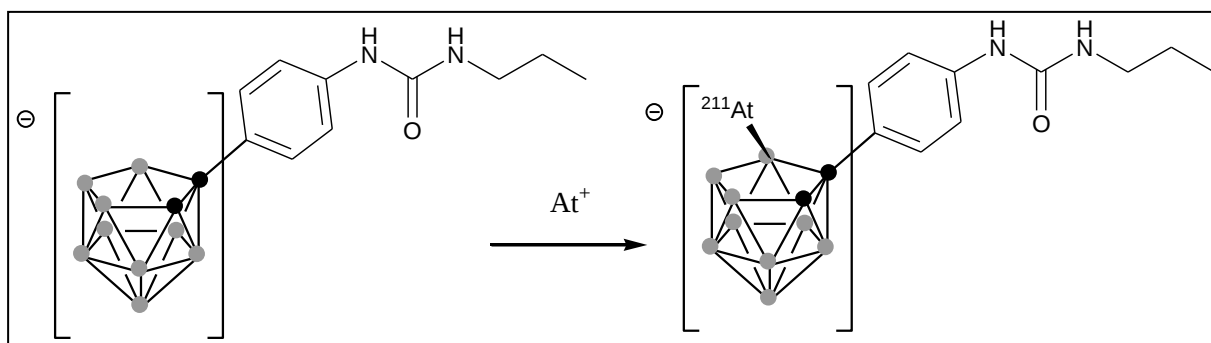


Figure 26 : formation d'un dérivé astaté de *nido*-carborane.

IV-3. Marquage de protéines à l'astate-211 pour la radioimmunothérapie alpha.

Différents systèmes de vectorisation de l'astate ont été envisagés pour amener l'astate sur les tumeurs :

- Des petites molécules organiques radiomarquées présentant un tropisme pour certaines cibles cancéreuses. Bien qu'une instabilité importante de la liaison C-At soit généralement observée *in vivo*, certains de ces composés montrent un potentiel thérapeutique intéressant tels que des dérivés du bleu de méthylène pour le traitement des mélanomes⁶¹ ou la meta-astatobenzylguanidine (MABG) pour les tumeurs cérébrales⁷⁸.

- Des peptides et des polypeptides dirigés contre des récepteurs spécifiques tels que l'octréotide qui se fixe sur les récepteurs de la somatostatine présents dans de nombreuses tumeurs humaines⁷⁹.

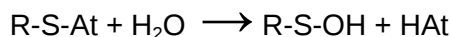
- Des suspensions colloïdales d'astate inorganique⁸⁰, des nanoparticules d'argent⁸¹ ou des nanotubes de carbones⁸². Ces méthodologies ont soit été simplement objets de preuves de principe ou n'ont pas donné de résultats de stabilité satisfaisants à ce jour pour des applications cliniques.

Les vecteurs immunologiques restent toutefois les plus largement étudiés et les plus prometteurs pour le développement de traitements à l'astate-211.

IV-3-1. Nécessité d'un marquage indirect.

Les premiers essais de marquage de protéines à l'astate-211 datent de 1975 avec notamment C. Aaij⁸³ qui, s'inspirant des connaissances sur le radiomarquage à l'iode, décrit la possibilité d'introduire l'astate sous forme At^+ . Des tests de stabilité montreront par la suite que le marquage n'est pas stable *in vivo*⁸⁴. L'instabilité de ce marquage sera attribué à la faiblesse de la liaison astate-carbone sur les sites de fixation supposés être les mêmes que ceux de l'iode : les résidus tyrosine et histidine des protéines (par substitution électrophile aromatique)⁸⁵.

Les travaux de G.W.M. Visser démontreront que les conditions de marquage employées ne permettent pas l'introduction d'astate sur la tyrosine et l'histidine^{86,87}. En revanche, ils mettent en évidence la formation de liaisons astate-soufre sur les résidus cystéines des protéines, conduisant à la libération progressive d'astature par hydrolyse et expliquant ainsi l'instabilité observée⁸⁸.



Une méthode de marquage en deux temps s'avère donc indispensable pour obtenir des stabilités satisfaisantes *in vivo*. Ces constatations ont rapidement amené au développement de petites molécules bifonctionnelles portant d'une part un groupement permettant l'introduction rapide de l'astate-211 sur un noyau aromatique et d'autre part le couplage à la protéine.

Le composé le plus largement utilisé aujourd'hui dans le développement de radiopharmaceutiques marqués à l'astate-211 est le trialkylstannybenzoate de N-succinimidyle qui possède un groupement organostannique permettant l'introduction de l'astate en position *para* ou *meta* par substitution électrophile aromatique dans un premier temps, et un ester activé permettant le couplage sur les lysines accessibles des protéines dans une deuxième étape (Figure 27)⁸⁹.

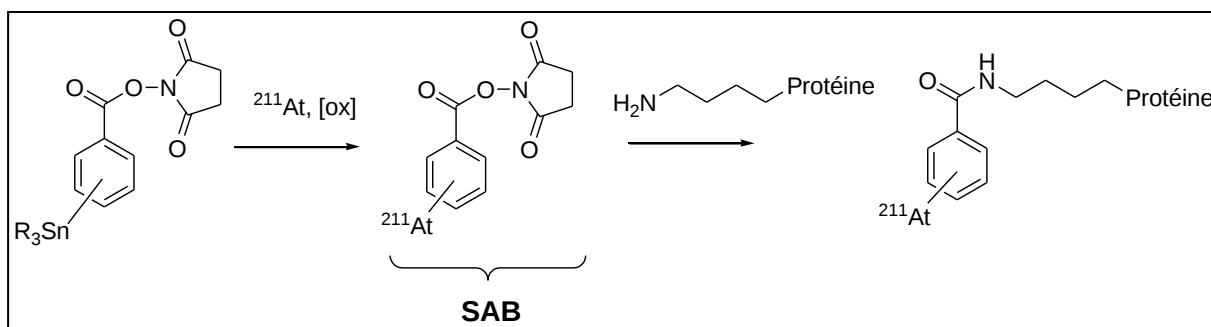


Figure 27 : Marquage en deux étapes d'une structure protéique à l'astate-211 via le SAB.

La première étape du marquage, réalisée en milieu organique, permet d'obtenir l'intermédiaire astatobenzoate de N-succinimidyle (SAB) avec de bons rendements (jusqu'à 90 %). L'étape de couplage est souvent beaucoup plus limitante, avec des rendements variables selon les protéines, celles-ci ne disposant pas toutes du même nombre d'amines réactives. De plus, la réaction de couplage est en compétition avec l'hydrolyse de l'ester activé du SAB dans les conditions nécessaires à la réaction (solution aqueuse tamponnée à pH 8 à 9) conduisant à des rendements de couplages compris entre 25 et 60 % en général. Chaque protéine nécessite une optimisation de couplage spécifique, les principaux paramètres ajustables étant le ratio SAB/protéine, la concentration en protéine ainsi que la durée et la température de réaction (entre 20 et 37 °C). L'ajout d'une petite proportion de DMF dans le milieu (maximum 20 % du volume total pour ne pas dénaturer la protéine) permet d'améliorer la solubilité du SAB et de potentiellement améliorer les interactions avec la protéine.

Le marquage de protéines par ce synthon a fait l'objet de nombreux articles lors de ces vingt dernières années. Il concerne en très large majorité les anticorps monoclonaux entiers, leurs fragments $F(ab')_2$ et dans une moindre mesure, leurs fragments Fab' (Tableau 12)

Dénomination	Forme	Cible	ref
C215	IgG	Carcinome colorectal	90
Anti-Tac	IgG	Recepteur IL-2R α (exprimé dans certains lymphomes)	91
MX35	$F(ab')_2$	Cancer ovarien épithelial	92
C110	IgG et $F(ab')_2$	Embryocarcinome	93
NR-ML-05	IgG et Fab'	mélanome	94

Tableau 12 : exemples d'anticorps couplés au SAB.

IV-3-2. L'instabilité du marquage via le SAB.

Bien qu'utilisé sur de nombreux vecteurs immunologiques, le SAB présente des limitations d'utilisation en raison d'une instabilité *in vivo* du marquage, en particulier dans le cas des composés rapidement métabolisés. Ce phénomène est plus prononcé dans le cas des fragments d'anticorps $F(ab')_2$ et Fab' ou dans le cas des anticorps entiers lorsqu'ils sont internalisés dans les cellules où ils sont sujets à des processus cataboliques supplémentaires⁹⁵ (en particulier à la protéolyse lysosomale).

Cette instabilité se manifeste, tout comme pour l'iode, par une accumulation de la radioactivité dans l'estomac et la thyroïde. Cette accumulation s'explique en grande partie par la libération de l'anion astature lors du catabolisme de la biomolécule radiomarkée. Sous cette forme, l'astate est alors pris en charge par le Sodium/Iodide Symporter (NIS), une protéine impliquée dans les transferts d'iodures dans l'environnement cellulaire de la thyroïde, mais aussi des glandes salivaires, de la muqueuse gastrique ou des glandes mammaires en période de lactation⁹⁶.

De plus, contrairement à l'iode, l'astate présente des taux de fixation élevés au niveau de la rate et des poumons. Cette différence de comportement pourrait être expliquée par l'oxydation d' At^- en At^+ *in vivo*, puisqu'il a été observé que l'injection préliminaire de thiocyanate (décrit comme formant des complexes avec At^+) permettait de diminuer l'accumulation dans ces organes⁹⁷.

Ainsi de nombreuses études comparatives montrent que lorsque des composés sont stables lorsqu'ils sont radiomarkés à l'iode, ils le sont beaucoup moins pour leurs équivalents astatés obtenus par la même méthode (Figure 28).

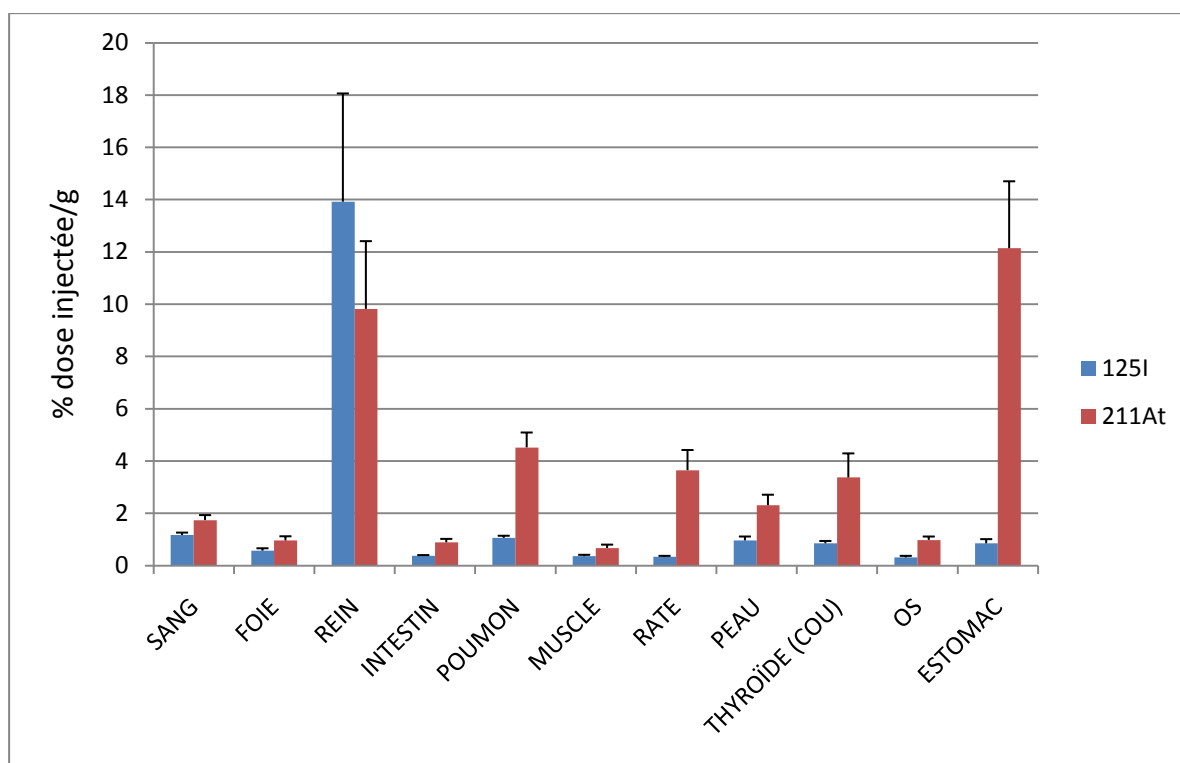


Figure 28 : exemple de biodistribution 4 heures après injection d'un anticorps sous forme $F(ab')_2$ marqué à l'iode-125 et à l'astate-211 par la méthode SAB⁹⁴.

Puisque les marquages sont stables *in vitro* (après incubation dans des solutions tampons à pH physiologique ou dans du sérum à 37°C) cette instabilité *in vivo* ne peut être attribuée à une rupture spontanée de la liaison carbone-astate. Il n'existe pas d'études expliquant directement les processus mis en jeu, mais les mécanismes de déhalogénéation enzymatiques sont supposés être similaires à ceux décrits pour l'iode⁹⁸.

Etant donné la haute toxicité des rayonnements dus à l'astate-211, des solutions doivent être apportées pour préserver les organes sains et permettre des applications biomédicales avec ce radioélément. Des modifications structurales du SAB ont ainsi été proposées. Elles visent principalement à modifier la densité électronique du noyau aromatique pour renforcer la liaison carbone-astate, par exemple en déconnectant du cycle le carbonyle impliqué dans la formation de la liaison au vecteur⁹⁹. Une autre voie envisagée est l'utilisation de groupements encombrants en ortho de l'astate visant à gêner les mécanismes de déhalogénéation enzymatique¹⁰⁰. Des groupements donneurs d'électrons π tels que des éthers ou des thioéthers en ortho de l'astate ont aussi été envisagés¹⁰¹. Le doublet de l'hétéroatome à proximité de la sphère de coordination de l'astate est dans ce cas supposé être susceptible d'apporter une stabilité supplémentaire (Figure 29).

Toutefois, aucune amélioration probante n'a été apportée par ces nouveaux composés et de nouvelles approches doivent être envisagées.

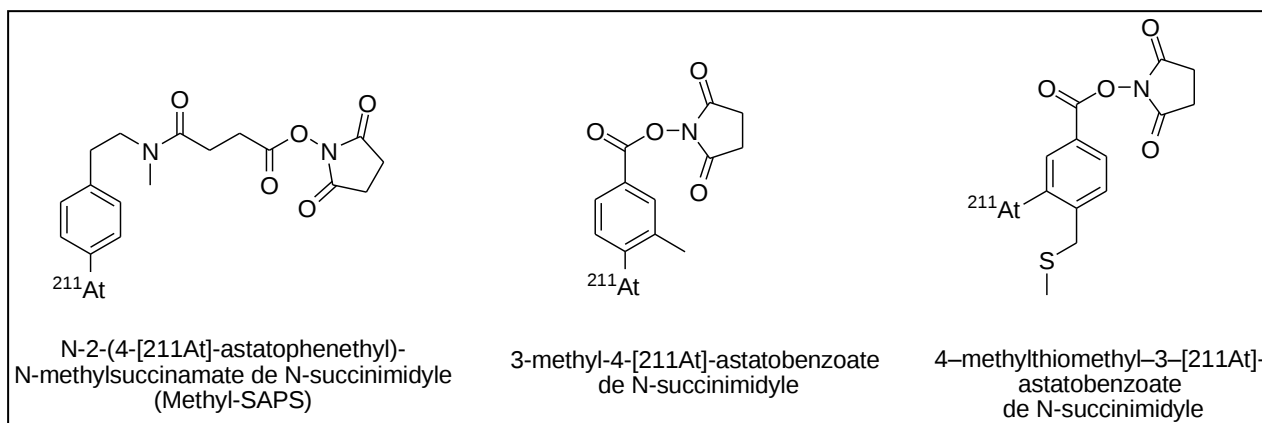


Figure 29 : modifications du SAB.

Plus originale, l'utilisation des cages de bores (voir page 46) a permis une nette amélioration de la stabilité de biomolécules marquées par cette méthode. Elles peuvent de plus être couplées aux protéines avant le marquage raccourcissant ainsi le temps de radiosynthèse. Ces composés restent cependant à optimiser puisque les anticorps radiomarqués par cette méthode présentent un comportement *in vivo* différent de l'anticorps originel avec, en particulier, une rétention de l'activité dans certains organes non spécifiques tels que le foie⁷⁷. Les modifications visant à améliorer l'élimination de la circulation des catabolites porteurs de la cage de bore sont donc nécessaires.

IV-3-3. Vers une introduction prochaine de l'astate-211 en clinique ?

Malgré les problèmes de stabilité de marquage limitant les utilisations envisageables aujourd'hui à des anticorps entiers, ou dans quelques cas à des fragments d'anticorps lentement métabolisés, l'efficacité de ce type de traitement a fait ses preuves à travers de nombreuses études *in vitro* ou préclinique sur différents modèles de tumeurs localisées ou de micrométastases.

IV-3-3-1. Expérimentations *in vitro*.

De nombreuses études ont pu démontrer *in vitro* le fort potentiel cytotoxique des rayonnements alpha issus de la désintégration de l'astate-211 couplé à un anticorps. Elles ont également permis la compréhension des mécanismes de mort cellulaire induite par ce type de rayonnement, ou d'envisager des essais précliniques avec certains anticorps.

A.K. Claesson publie en 2007 une étude démontrant que dans le cas de l'astate-211, les dommages induits au niveau de l'ADN étaient plus importants que ceux générés par un

émetteur gamma (^{60}Co) ou par une source de rayon X^{102} . Les effets observés sont une cassure double brin de l'ADN qui a pour conséquence la mort de la cellule.

Le huA33, un anticorps humanisé dirigé contre l'antigène A33 (exprimé dans la plupart des carcinomes colorectaux), radiomarké via le SAB montre de bons résultats en milieu cellulaire avec 5% de survie de cellules tumorales pour 56 désintégrations par cellule et 0,3% de survie pour 150 désintégrations par cellules¹⁰³. Ces données ont permis d'initier des études d'efficacité *in vivo* pour le traitement des carcinomes colorectaux métastasés.

IV-3-3-2. Essais précliniques

De nombreuses études *in vivo* sur des souris porteuses de divers modèles de tumeur ont été publiées. Elles ont permis de mettre en évidence un effet biologique du traitement par l'astate-211 supérieur à des émetteurs gamma ou bêta, une inhibition de la croissance tumorale ou une diminution de la masse tumorale selon les doses injectées et un allongement de la survie des animaux traités par ce type de thérapie. En raison des problèmes de stabilité des marquages à l'astate-211, les modèles limitant la métabolisation de l'anticorps sont privilégiés. Ainsi les études de radioimmunothérapie alpha portent le plus souvent sur des modèles faisant intervenir une injection intra-cavitaire au plus près de la tumeur (principalement intrapéritonéale), environnement dans lequel la circulation dans l'organisme et la métabolisation de l'anticorps radiomarké sont limités.

La supériorité de l'astate-211 par rapport à un émetteur β^- (l'iode-131) a ainsi pu être démontrée sur un modèle murin de cancer ovarien¹⁰⁴. Le MOv18, un anticorps dirigé contre les cellules OVCAR-3, une lignée de cellule cancéreuse ovarienne, est radiomarké et injecté dans le péritoine des souris porteuses de la maladie (310-400 kBq d'astate-211 ou 5100-6200 kBq d'iode-131). Les résultats montrent que six semaines après traitement, aucune des dix souris traitées à l'astate-211 ne présente de tumeurs macroscopiques ni d'ascites alors qu'une seule souris présente des traces de microtumeurs. Dans le cas du traitement à l'iode-131, seulement trois des dix souris ne présentent aucun de ces symptômes.

S. Palm publie en 2007 une étude de l'utilité potentielle du trastuzumab marqué à l'astate-211 pour le traitement du carcinome ovarien. Dans ce modèle, des cellules SKOV-3 connues comme étant radorésistantes¹⁰⁵ sont transplantées à des souris. Les résultats montrent un effet dose dépendant sur la régression de la tumeur avec un optimum de 400kBq d'astate-211 56 jours après traitement comparé aux souris non traitées. Une éradication complète de la tumeur est observée en associant une injection de trastuzumab

radiomarké à 500µg de trastuzumab froid. Cette étude démontre l'efficacité de la radiothérapie alpha associé à un autre type de traitement (immunothérapie dans ce cas).

Quelques études par injection systémique ont également été réalisées, mais en proportions plus faibles par rapport aux modèles en intra-cavitaire présentés ci-dessus. L'efficacité du traitement sur un modèle murin de leucémie a pu être évaluée avec un anticorps spécifique (le HeFi-1). Le HeFi-1 seul présente déjà un effet cytotoxique sur les cellules ciblées. Les résultats montrent une efficacité du traitement accrue lorsque l'anticorps est radiomarké à l'astate-211 avec une médiane de survie nettement allongée par rapport à l'anticorps seul¹⁰⁶.

IV-3-3-3. Essais cliniques phase I

A ce jour, seulement deux essais cliniques de phase I ont été effectués avec injection d'anticorps radiomarkés en intra-cavitaire.

Le premier a été publié en 2007 par M.R. Zalutsky dans le cadre du traitement de tumeurs résiduelles cérébrales de type gliome après chirurgie¹⁰⁷. Le traitement classique de ce type de pathologie est une résection chirurgicale de la tumeur associée à des séances de radiothérapie externe et de chimiothérapie. Dans le cadre de cette étude, les patients ont reçu en plus une injection d'anticorps radiomarké à l'astate-211 dans la cavité résultante de la résection. L'anticorps employé est le ch81C6, un anticorps chimérique dirigé contre la tenascine, une protéine présente à la surface des cellules tumorales de type gliome. Le ch81C6 est radiomarké à l'astate-211 (71 à 347MBq) par l'intermédiaire du SAB.

La biodistribution de l'anticorps est suivie par gamma-caméra et montre que 10 h après administration, la quasi-totalité de l'activité reste présente dans la cavité de résection chirurgicale (96,7±3,6 %). Les prélèvements sanguins montrent que moins de 0,05 % de l'activité est présente dans le sang. Ces données mettent en évidence le faible catabolisme de l'anticorps dans la cavité de résection où il reste localisé. Les résultats finaux démontrent l'intérêt de ce type de traitement avec une médiane de survie qui passe de 31 semaines pour le traitement classique à 54 semaines pour le traitement à l'astate-211.

Le second essai de phase I publié à ce jour est une étude de dosimétrie et de pharmacocinétique d'un fragment F(ab')₂, du MX35, un anticorps ciblant les cellules tumorales du cancer épithélial ovarien¹⁰⁸. Le traitement conventionnel est une chirurgie associée à une chimiothérapie, mais dans de nombreux cas la maladie resurgit avec de faibles espoirs de survie. Cette étude vise à montrer le potentiel de l'astate-211, émetteur alpha, suite à l'échec des essais cliniques poussés jusqu'en phase III avec un émetteur bêta

(Yttrium-90 couplé à l'anticorps HMFG1). Cet échec est attribué à la nature du radionucléide et aux particules bêta inadaptées au traitement des microtumeurs.

Les patientes traitées reçoivent l'administration de l'anticorps (marqué à l'astate-211 par le SAB) par infusion dans le péritoine d'une activité comprise entre 20 et 100MBq. Le suivi par gamma-caméra montre que l'activité reste principalement dans l'abdomen mais qu'une accumulation importante au niveau de la thyroïde se produit pour les patientes dont la thyroïde n'a pas été bloquée préalablement avec de l'iodure de potassium ou du perchlorate de potassium. Les autres organes ne présentent pas d'accumulation d'activité notable. Les études de dosimétrie montrent que ce type de traitement permet de déposer à proximité des micrométastases des activités d'astate-211 nécessaires à leur destruction sans toxicité notable pour la moelle osseuse ou d'autres organes sains chez la femme. Des études plus poussées sont nécessaires pour évaluer le réel gain thérapeutique de ce type de traitement avec notamment l'utilisation d'activités plus importantes et un suivi sur le long terme concernant la récurrence.

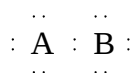
Si ces deux études montrent une utilité potentielle de la radioimmunothérapie alpha avec l'astate-211, les essais cliniques sont aujourd'hui encore trop rares. Les raisons sont les difficultés à obtenir les autorisations d'essais cliniques sur les émetteurs alpha qui sont encore trop peu connus, mais aussi à la faible disponibilité de l'astate-211 nécessaire pour mener à bien ces études. Le nombre de composés utilisables aujourd'hui est de plus limité par les problèmes de stabilité *in vivo* rencontrés et des solutions doivent être proposées. Une partie du problème pourra peut-être être apportée par une meilleure compréhension et une meilleure maîtrise de la chimie de l'astate-211 et par l'apport de nouvelles méthodes de marquage des anticorps et autres biomolécules d'intérêt.

V. L'iode hypervalent : modèle pour la stabilisation des marquages à l'astate-211 ?

V-1. La liaison hypervalente.

V-1-1. Règle de l'octet et hypervalence¹⁰⁹

La règle de l'octet, proposée par G.N. Lewis en 1916¹¹⁰, est une loi empirique selon laquelle les atomes dans les molécules ont toujours huit électrons dans leur couche de valence (à l'exception des éléments de transition ou de $Z < 5$). Ils forment entre eux des liaisons covalentes constituées de deux électrons également partagés entre les deux atomes impliqués dans la liaison (règle du duet). Ce modèle simple permet d'expliquer en partie la réactivité des molécules, mais il ne prend pas en compte la polarité des liaisons. La structure de Lewis d'une molécule diatomique AB s'écrit donc ainsi :



Pourtant dès l'établissement de cette règle, des exceptions telles que PCl_5 et SF_6 sont connues (l'atome central comportant respectivement 10 et 12 électrons de valence). Un nombre de plus en plus important de composés comportant un atome qui excède la valence classique sont ensuite rapidement découverts. Le terme hypervalent fut attribué à ce type de composés par Musher en 1969¹¹¹. Il concerne les molécules ou les ions constitués d'éléments du groupe p (auquel s'ajoutera ensuite le groupe s) comportant plus de huit électrons dans leur couche de valence. Puisque les atomes concernés appartiennent à la troisième période ou plus, le rôle des orbitales d fut évoqué pour expliquer ce phénomène avec notamment la formation de liaisons faisant intervenir des orbitales hybridées de type sp^3d^n . Toutefois, il a plus tard été démontré par des calculs *ab initio* que les orbitales d n'avaient que très peu d'influence sur la formation des liaisons hypervalentes¹¹².

Cette constatation a permis à un autre modèle de s'imposer, celui de la liaison à trois centres et quatre électrons (3c-4e) initialement proposé par Rundle¹¹³. Dans ce modèle, la liaison est composée de trois atomes (l'atome hypervalent et ses deux ligands) et de 4 électrons. Les électrons en excès sont délocalisés sur les substituants de l'atome central. Il en résulte une charge d'environ -0,5 sur les substituants et d'environ +1,0 sur l'atome hypervalent. Dans ce système le nombre d'électrons effectifs dans la couche de valence de

l'atome central ne dépasse donc pas huit, ce qui lui permet de respecter la règle de l'octet dite « modifiée ». Cette règle diffère de celle établie par Lewis du fait de la prise en compte de la polarisation des liaisons et donc du fait que les électrons des liaisons ne contribuent pas également à la couche de valence des atomes impliqués. Dans ce modèle, les atomes respectent la règle modifiée de l'octet s'ils possèdent huit électrons effectifs ou moins dans leur couche de valence.

Le modèle de la liaison 3c-4e a d'abord été appliqué à des molécules telles que ICl_2^- , F_3^- , ou I_3^- . Les trois atomes participant à la liaison sont colinéaires, faisant intervenir chacun une de leurs orbitales p pour former des orbitales moléculaires Ψ_1 liante et Ψ_2 non liante toutes les deux occupées et une orbitale moléculaire Ψ_3 antiliante vacante (Figure 30).

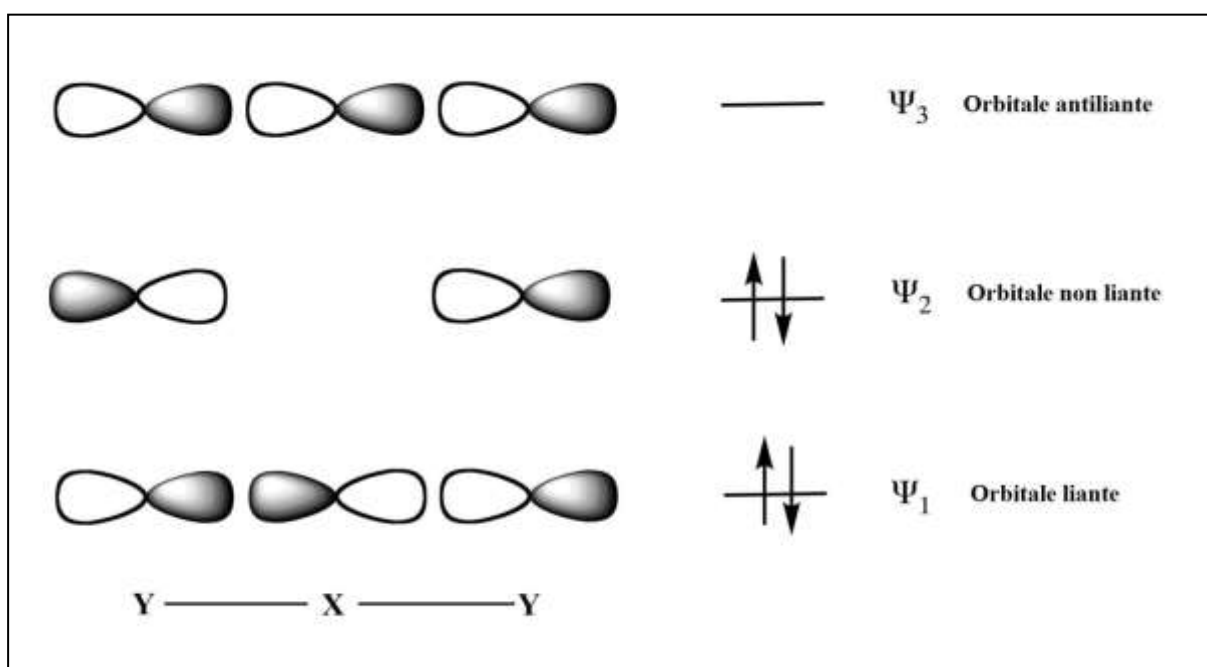


Figure 30 : orbitales moléculaires d'une structure de type XY_2 d'après le modèle 3c-4e.

Un composé hypervalent tel que PF_5 est donc décrit comme constitué de trois liaisons P-F équatoriales formées à partir d'orbitales hybridées sp^2 du phosphore et d'une liaison 3c-4e formée à partir de l'orbitale p restante plaçant les deux autres fluors en position axiale. Les liaisons P-F axiales (apicales) sont plus longues et plus faibles que les équatoriales. Dans le cas de SF_6 toutes les liaisons sont équivalentes et de type 3c-4e.

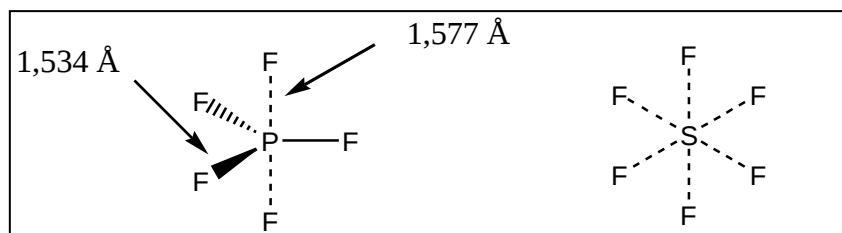


Figure 31 : molécules de PF_5 et SF_6 , les liaisons hypervalentes apparaissent en pointillé.

Une nomenclature commune a été mise en place par Perkins et al.¹¹⁴ pour l'ensemble des composés hypervalents. Elle est notée N-X-L, N correspondant au nombre d'électrons de la couche de valence de l'atome central X, et L au nombre de ligands (substituants). Ainsi, l'atome de xénon dans XeF_2 sera classé en 10-Xe-2, le phosphore classé 10-P-5 dans PF_5 , etc.

V-1-2. La remise en cause du concept d'hypervalence

Bien qu'il ait permis de résoudre de nombreuses incohérences posées par le modèle des orbitales hybridées sp^3d^n , le modèle de la liaison à trois centres et quatre électrons ainsi que le concept même de la liaison hypervalente ont été remis en cause, en particulier par R.J. Gillespie. Les progrès des méthodes de calculs *ab initio* permettent aujourd'hui de modéliser la population électronique de la couche de valence des atomes hypervalents. S. Noury, B. Silvi et R. Gillespie ont ainsi observé que le nombre d'électrons présents dans la couche de valence de l'atome central d'une molécule hypervalente pouvait être largement inférieur à huit avec des substituants électronégatifs, mais qu'il pouvait aussi être supérieur à huit pour des substituants moins électronégatifs¹¹⁵ (Tableau 13). Ces derniers ne respectent donc pas la règle de l'octet modifiée. Les auteurs suggèrent donc d'abandonner cette règle, jugée inutile puisque non respectée par de nombreux composés.

Composé	Valence de l'atome central
PF_5	5,33
PCl_5	7,13
PMe_5	9,42
AsCl_5	6,10
AsMe_5	9,68

Tableau 13 : population de la couche de valence de l'atome central de composés hypervalents calculée par la fonction ELF (Electron Localization Function)¹¹⁵.

De plus, constatant que la nature des liaisons dans les molécules hypervalentes n'a pas de différence fondamentale avec les liaisons covalentes des molécules respectant la règle de l'octet, les auteurs suggèrent d'abandonner le terme hypervalent qui n'a pas de

réelle signification. Cette suggestion est appuyée par R.J. Gillespie considérant le cas des molécules hypervalentes comportant des liaisons multiples¹¹⁶. Il prend l'exemple d' H_3PO_4 qui est aujourd'hui considéré comme une molécule hypervalente, le phosphore étant à l'état d'oxydation +5 et formant cinq liaisons (3 simples et une double, voir structure **(1)** en Figure 32) alors que la liaison double a longtemps été décrite comme 50 % covalente et 50 % ionique afin de respecter la règle de l'octet (structure **(2)**). On peut se demander alors pourquoi un composé tel que HNO_3 n'est pas considéré comme hypervalent et est communément représenté selon la structure **(4)** respectant la règle de l'octet et pas selon la structure **(3)**. En effet, si l'on considère le cas de NOF_3 (communément représenté selon la structure **(6)**), la liaison NO a une longueur de 115,8 pm, quasiment égale à la liaison $\text{N}=\text{O}$ dans NO_2^+ (115 pm). La liaison N-F (143,1 pm) y est plus longue qu'une liaison N-F classique (136,5 pm), cette différence étant due à la répulsion stérique entre fluors trop resserrés sur l'atome d'azote de petite taille. Gillespie estime donc qu'il n'y a pas de raison de ne pas représenter NOF_3 sous forme hypervalente **(5)**. Ces constatations conduisent ainsi l'auteur à conclure que de nombreux composés communs peuvent être considérés comme hypervalents et que ces composés ne se révèlent pas réellement différents de ceux respectant la règle de l'octet. L'utilité d'une classe à part appelée « hypervalent » ne semble donc pas justifiée.

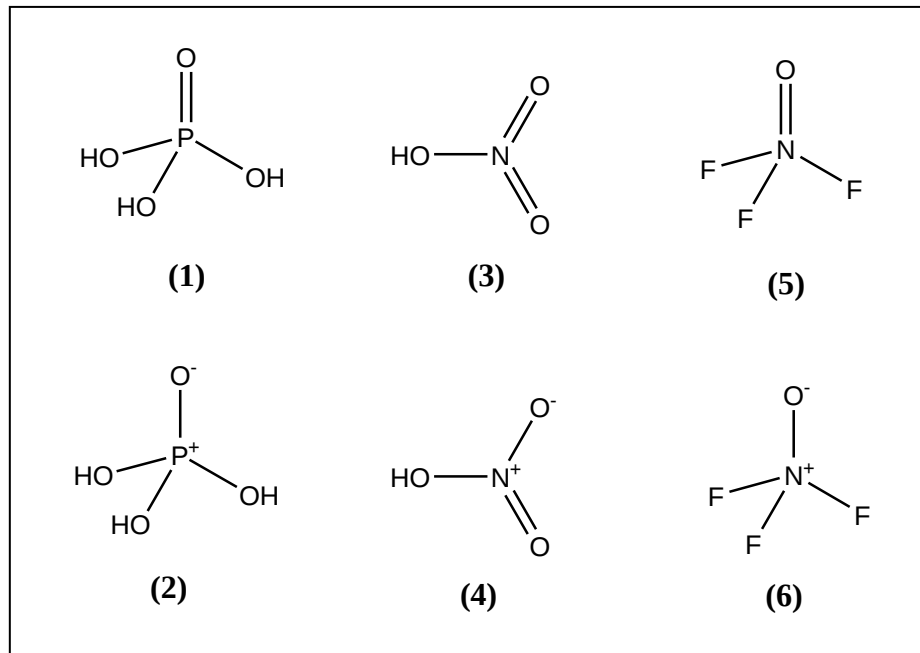


Figure 32 : H_3PO_4 , HNO_3 et NOF_3 représentés sous forme respectant la règle de l'octet et sous forme hypervalente.

Malgré cette controverse sur la réelle nature de la liaison hypervalente, la majorité des articles publiés aujourd'hui s'appuie sur le modèle de la liaison à trois centres et quatre

électrons. C'est donc ce modèle qui sera conservé dans les prochaines pages de ce mémoire.

V-2. Propriétés des iodes hypervalents¹¹⁷

C'est en 1886 que C. Willgerodt prépare le premier composé organoiodé hypervalent, le (dichloroiodo)benzène (PhICl_2) à partir de l'iodobenzène en présence de dichlore¹¹⁸. De nombreux autres composés de ce type ont rapidement été découverts et les iodes hypervalents sont aujourd'hui largement utilisés en synthèse organique. Les structures les plus courantes et utiles en chimie organique sont les iodes (III) (iodoniums 8-I-2 et iodanes^e 10-I-3) et les iodes (V) (periodanes^f 10-I-4 et 12-I-5) bien que d'autres structures allant jusqu'à sept ligands soient également décrites (Figure 33).

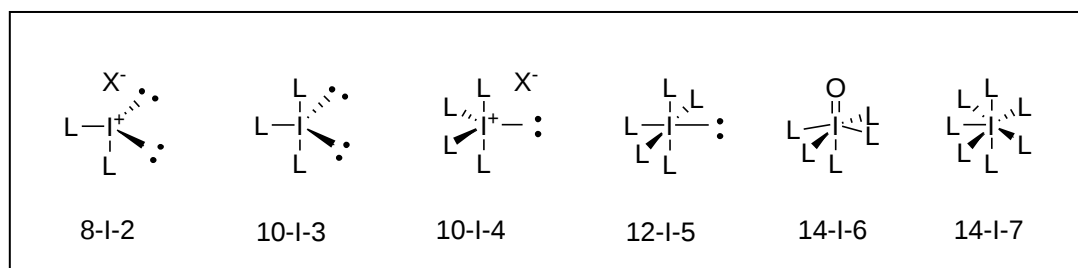


Figure 33 : structures possibles des iodes hypervalents.

Les iodes(III) de type 10-I-3 possèdent généralement un ligand carboné et deux ligands de type hétéroatome. Les ligands les plus électronégatifs se trouvent en positions axiales pour former la liaison à trois centres et quatre électrons. Le ligand le moins électronégatif ainsi que les deux doublets non liants sont en positions équatoriales. La préférence des groupements électronégatifs pour la position axiale s'explique par la présence des charges négatives aux extrémités de la liaison 3c-4e ce qui permet d'abaisser l'énergie de la liaison hypervalente. Les λ_3 -iodanes ont une géométrie en forme de T, ou de bipyramide trigonale si l'on considère les doublets non liants. La longueur des liaisons I-L est plus longue que la somme des deux rayons covalents, mais plus courte qu'une liaison purement ionique (par exemple 2,15-2,16 Å pour la liaison I-O dans $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ contre 1,99 Å pour la somme des rayons covalents de I et O¹¹⁹). Des structures extrêmement variées sont connues. Les plus courantes sont de types iodosylarène ($\text{PhI}=\text{O}$), halogéné (PhIX_2) ou carboxylé ($\text{PhI}(\text{OAc})_2$) et permettent l'accès à de nombreux dérivés plus complexes.

^e Le terme iodane désigne à l'origine l'iodure d'hydrogène HI. Les iodanes notés également λ_3 -iodanes se retrouvent sous les termes iodanes ou iodinanés dans les textes en anglais.

^f Notés également λ_5 -iodanes. Nommés periodanes ou periodinanés en anglais.

Les iodoniums 8-I-2 sont considérés comme ioniques avec une distance d'environ 2,6-2,8 Å entre l'iode et l'anion et ont généralement une structure de type $R_2I^+X^-$ (R : ligand de type carbone sp^2 ou sp^3 ; X : hétéroatome). Avec huit électrons dans leur couche de valence, ils ne devraient pas être considérés comme hypervalents selon la règle de l'octet. Toutefois, si l'on considère le contre ion, leur structure est en forme de T similairement aux λ_3 -iodanes comme en attestent les analyses par diffraction X (cas du triflate d'alkynyliodonium¹²⁰). Les plus étudiés sont les dérivés aryle ou hétéroaryle en raison de leur stabilité et des nombreuses applications synthétiques possibles.

La réactivité des iodes(III) (iodonium et λ_3 -iodanes) est basée sur des mécanismes d'échanges de ligands et/ou d'éliminations réductrices génératrices de carbocations ou de carbènes et sur les possibilités de former des radicaux par clivage homolytique des liaisons hypervalentes. Ces processus sont favorisés par un retour à l'état monovalent plus stable (Figure 34). Ils permettent la formation de nombreux types de liaisons (C-C, C-halogène, C-hétéroatome, hétéroatome-hétéroatome, etc.)¹²¹.

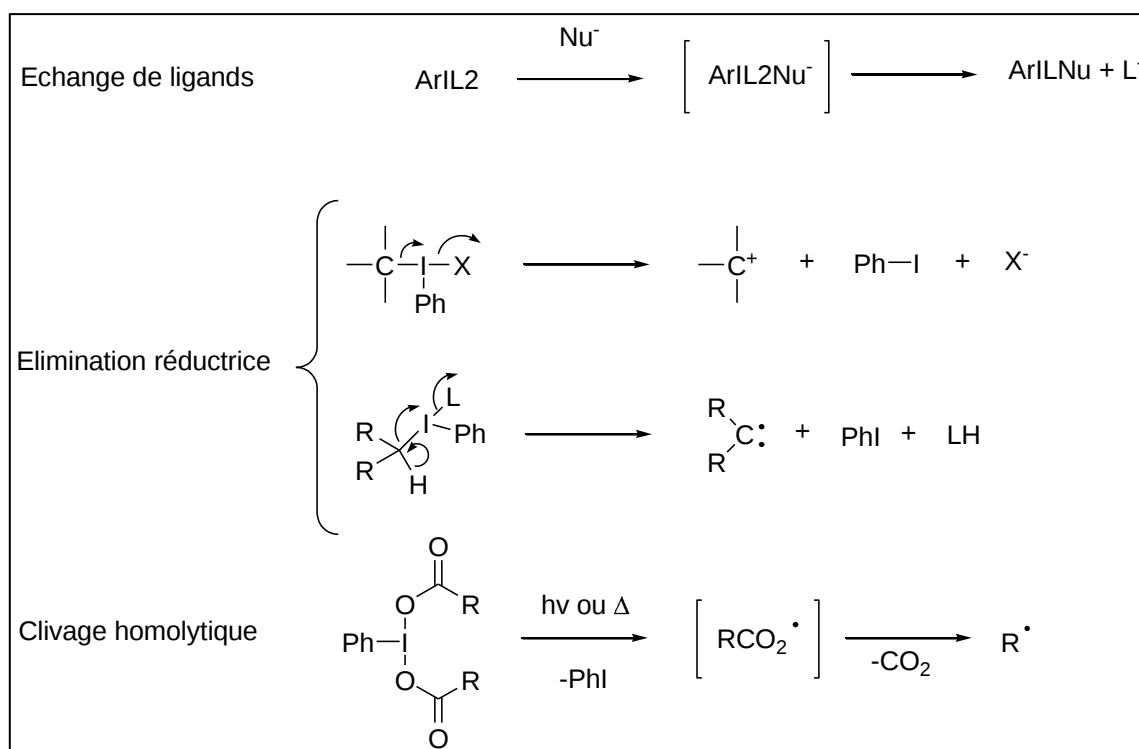


Figure 34 : réactivités générales d'iodes (III) hypervalents.

Les periodanes (état d'oxydation (V)) sont de structure pyramidale à base carrée, pseudo-trigonale ou pseudo-octaédrique selon le nombre et la nature des ligands. Les quatre ligands les plus électronégatifs participent aux deux liaisons 3c-4e en positions équatoriales, le ligand carboné ainsi que le doublet de l'iode non liant se situant en positions axiales. Beaucoup moins étudiés que l'état d'oxydation (III) en raison de leur faible stabilité,

les iodes (V), dont les plus connus sont l'IBX (acide 2-iodoxybenzoïque) et le DMP (Dess-Martin Periodane), ont pour principales applications les oxydations (en particulier l'oxydation des alcools en carbonyles) ¹²².

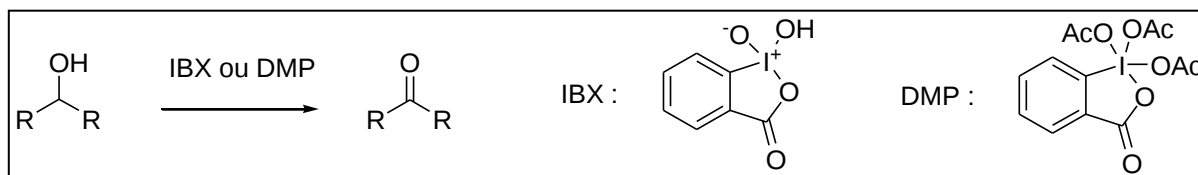


Figure 35 : oxydation par l'IBX ou le DMP.

V-3. Stabilisation de l'état d'oxydation (III)

Les iodes hypervalents sont des espèces réactives cherchant à se stabiliser par retour à l'état monovalent. Cette réactivité peut être modulée en fonction des substituants et l'état hypervalent peut être stabilisé selon plusieurs paramètres. Il a ainsi été largement démontré que les espèces hypervalentes pouvaient être stabilisées par incorporation dans un cycle à cinq chaînons¹²³. Cette stabilisation est expliquée par un meilleur recouvrement des paires d'électrons non liants avec les orbitales π du noyau aromatique associé¹²⁴. Il a de plus été expliqué précédemment que la présence de ligands électronégatifs en position axiale était énergétiquement plus favorable.

Ces observations ont amené J.C. Martin à développer un ligand bidentate visant à stabiliser les espèces hypervalentes. Nommé communément ligand de Martin, il a permis d'isoler en 1979 le premier composé de type bromiodane sous forme cristalline, stable à l'eau et à l'air¹²⁵ (Figure 36).

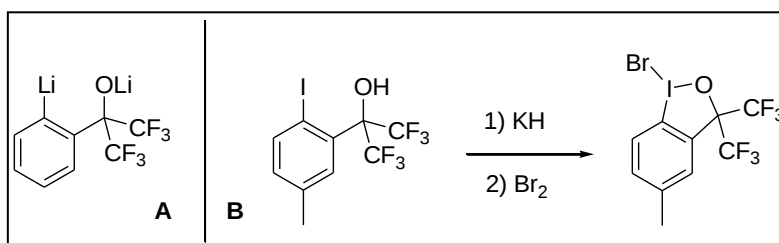


Figure 36 : (A) : Ligand de Martin, (B) : Formation d'un dérivé bromé d'iode hypervalent stable.

Dans cette structure, le rôle des trifluorométhyles est primordial puisqu'ils permettent d'augmenter l'électronégativité de l'oxygène en position apicale et donc de renforcer la stabilité de la liaison hypervalente. Les auteurs observent ainsi une réactivité moindre face à l'hydrolyse en milieu alcalin par rapport à l'analogue méthylé. D'autre part la présence en cette position des CF_3 , encombrants, favorise la formation du cycle par effet Thorpe-Ingold

ou effet *gem*-dialkyle¹²⁶ conduisant à la compression de l'angle entre le noyau aromatique et l'oxygène impliqués dans le cycle (Figure 37).

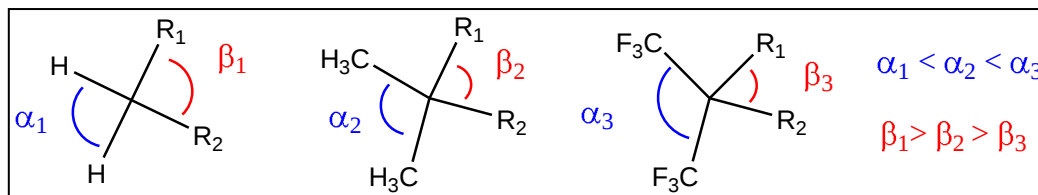


Figure 37 : Effet Thorpe-Ingold.

Dans la série des halogènes, l'iode est le seul à pouvoir former facilement des liaisons organohypervalentes suffisamment stables pour former des composés isolables et de nombreuses molécules de ce genre sont décrites dans la littérature¹²⁷. Les bromes hypervalents sont beaucoup plus difficiles à isoler. Un seul exemple est décrit dans la littérature et a nécessité une stabilisation maximale avec notamment la formation d'une structure spirobicyclique pour pouvoir être isolé¹²⁸. Le chlore et le fluor sont, quant à eux, trop peu polarisables pour former des composés de ce type suffisamment stables pour être isolés.

Ces observations permettent de supposer que l'astate, l'élément plus lourd dans la série des halogènes et par conséquent le plus polarisable, est susceptible de former des liaisons hypervalentes de stabilité supérieure à celles de l'iode. Sous cette forme, l'accès à l'astate par les enzymes responsables des phénomènes de déshalogénation *in vivo* pourrait être perturbé. L'encombrement stérique dans l'environnement de d'astate et la modification de la structure dans l'environnement de cet atome pourrait rendre inaccessible le site de déshalogénation de la protéine et même perturber les processus mis en jeu dans la rupture de la liaison C-At. Si les liaisons hypervalentes formées par l'astate sont suffisamment stables pour résister aux conditions présentes dans l'organisme, la stabilité des marquages des anticorps pourrait ainsi être améliorée.

L'objectif du travail de thèse présenté dans les pages suivantes a donc été de démontrer dans un premier temps la possibilité de former des composés organoastatés hypervalents à l'aide d'un précurseur organostannique conçu pour en optimiser la stabilité. Des dérivés bifonctionnalisés ont ensuite été préparés dans le but d'évaluer la stabilité *in vitro* et *in vivo* de ce type de radiomarquage. Appliqué à des vecteurs immunologiques adaptés, ce type de radiomarquage à l'astate-211 pourrait trouver des applications en radioimmunothérapie alpha des cancers en palliant le manque de stabilité des méthodes de marquage connues aujourd'hui avec ce radioélément.

RÉSULTATS

Introduction : présentation du sujet de recherche

Le but de ce travail de recherche a été de démontrer la possibilité de former des composés organoastatés hypervalents et de mettre au point une nouvelle méthode de radiomarquage des anticorps avec de l'astate-211 sous cette forme, la finalité de ce projet étant d'une part de contribuer à l'enrichissement des connaissances de la chimie de l'astate, encore assez peu développée, et d'autre part d'évaluer le gain de stabilité apporté par ce nouveau type de radiomarquage des anticorps.

Les structures de type λ^3 -iodane stabilisées par le ligand bidentate de Martin présentées précédemment (Figure 36 en page 61) ont été envisagées comme modèle de départ pour la conception d'analogues hypervalents astatés. Ces structures ont été choisies en raison de leur simplicité, de la possibilité de concevoir des précurseurs stanniques adaptés et des conditions de préparation des espèces hypervalentes adaptables aux conditions de synthèse radiochimique particulières à l'astate-211 (Figure 38).

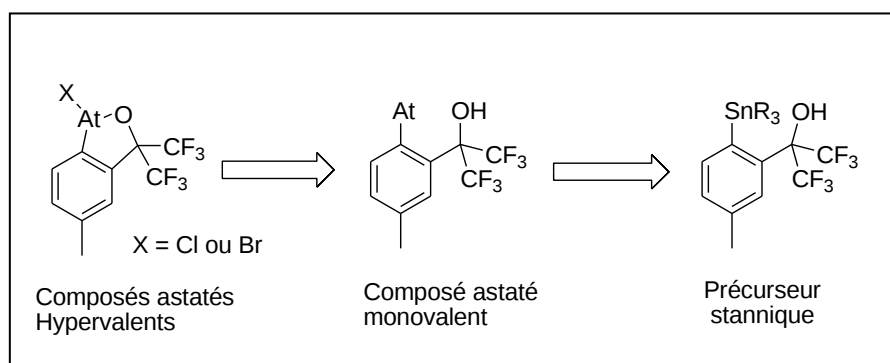


Figure 38 : Stratégie initiale envisagée.

Les résultats présentés dans les pages suivantes sont organisés en deux parties. La première partie concerne l'étude de la faisabilité de la préparation de composés astatés hypervalents analogues aux dérivés iodés décrits par Amey et Martin. Pour cela, la synthèse d'un précurseur organostannique permettant l'accès à ces composés a été nécessaire. La mise au point de la formation des espèces hypervalentes a été réalisée dans un premier temps avec l'iode-125, plus facile d'accès et plus pratique à utiliser que l'astate-211 en raison de sa demi-vie longue (60 jours). Ces résultats ont ensuite permis la transposition à la préparation d'analogues astatés. Ceux-ci ont été caractérisés par chromatographie et identifiés par comparaison avec les équivalents iodés.

La seconde partie décrit la conception de précurseurs stanniques bifonctionnels donnant accès aux composés hypervalents astatés pouvant être couplés à un vecteur. La synthèse d'un dérivé de la biotine est décrite comme modèle simple de marquage direct. Pour les structures protéiques de type anticorps, nécessitant des radiomarquages indirects en deux étapes (marquage du précurseur puis couplage), des précurseurs dérivatisés sous forme d'esters activés ou de maléimides sont également présentés. La faisabilité du radiomarquage d'une structure protéique a pu être démontrée et les résultats préliminaires de stabilité de ce type de radiomarquage sont présentés.

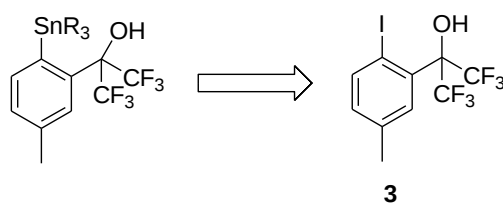
I. Mise au point de la méthode sur un modèle simple

I-1. Synthèse du précurseur stannique

I-1-1. Méthode directe

Le choix du type de précurseur s'est orienté vers un organostannique en raison des conditions douces généralement nécessaires pour le radiomarquage à l'astate de ce type de composé (aspect développé précédemment en page 44). Sur un précurseur non fonctionnalisé pour le couplage aux anticorps, l'échange halogène/halogène est également envisageable, mais en raison des conditions dures généralement requises, cette méthode ne serait sans doute pas adaptée aux précurseurs plus sensibles nécessaires au couplage à des protéines. Il a dans un premier temps été envisagé d'introduire le groupement stannique directement à partir du dérivé iodé **3** permettant l'accès aux dérivés iodés hypervalents décrit par Amey et Martin¹²⁵ (Schéma 1) :

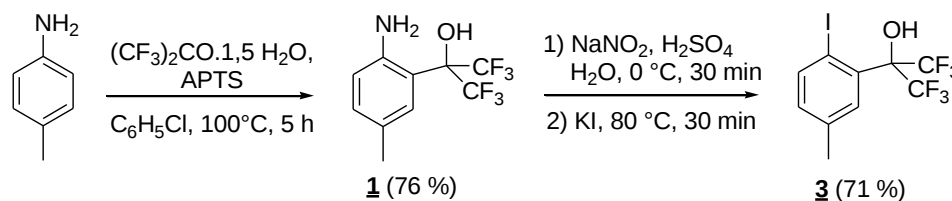
Schéma 1 :



Ce type de composé présente l'avantage de posséder une structure relativement simple pour le développement des méthodes de radiomarquage tout en portant sur son noyau aromatique un méthyle facilement modifiable ultérieurement pour l'accès à des composés bifonctionnalisés qui permettront le couplage avec des structures protéiques. L'accès au composé **3** est décrit à partir de la para-toluidine en deux étapes¹²⁵. La première consiste en l'introduction du groupement hexafluoroisopropanol en ortho du groupement amine par substitution électrophile aromatique de l'hexafluoroacétone en présence d'APTS dans le chlorobenzène. Amey et Martin décrivent cette réaction avec de l'hexafluoroacétone pure qui est un gaz. Nous avons préféré l'utilisation d'hexafluoroacétone hydratée qui est un liquide, plus simple à utiliser. Un rendement très proche de la publication originale est obtenu (76 % contre 80 %). Le composé **3** est ensuite obtenu par génération du sel de diazonium en présence d'acide nitreux suivi de la substitution par l'iodure. Si la publication originale décrit

l'utilisation de bronze en tant que catalyseur, les mêmes conditions sans catalyseur nous ont permis d'obtenir un rendement supérieur (71 % contre 40 %), (Schéma 2).

Schéma 2 :



L'introduction du groupement stannique a initialement été envisagée par des méthodes de couplage catalysées au palladium couramment utilisées pour la formation de ce type de composés. L'introduction d'un groupement tributylstannyle sur un dérivé aromatique halogéné peut s'effectuer dans le toluène en présence d'hexabutyldistannane et de tétrakis(triphénylphosphine)palladium(0)¹²⁹. Des essais dans de telles conditions sur le composé **3** n'ont montré aucune conversion du dérivé iodé de départ. Ceci peut être expliqué par la gêne stérique induite par le groupement hexafluoroisopropanol en ortho de l'iode qui empêche l'approche du composé palladié volumineux. L'hexabutyldistannane est lui aussi un groupement encombrant, c'est pourquoi d'autres essais ont été réalisés avec l'hexaméthyl-distannane pour minimiser les perturbations par gêne stérique. L'emploi d'hexaméthyl-distannane et de dichlorobis(triphénylphosphine)palladium (II) dans le dioxane, conditions standards pour former ce type de composé, s'est également révélé infructueux, même à des températures plus élevées et sous pression. L'accès à des organostanniques aromatiques à partir de dérivés halogénés est également décrit par formation d'intermédiaires zincique suivi d'une transmétallation avec le chlorure d'étain correspondant. Des essais basés sur une méthode « one-pot » catalysée au cobalt décrite récemment par C. Gosmini et J. Périchon¹³⁰ ont été effectués. Mais la formation du composé d'intérêt n'est pas observée, le dérivé iodé de départ étant retrouvé intact.

Ces constatations nous ont conduit à envisager une autre voie, consistant à générer un intermédiaire lithien, par échange iode/lithium, suivi d'une transmétallation avec le chlorure d'étain correspondant. Bien que moins sensible aux phénomènes d'encombrement stérique, cette méthode présente l'inconvénient de ne pas être compatible avec de nombreuses fonctions chimiques réactives vis-à-vis des bases et des nucléophiles. L'introduction du groupement stannique a également été tentée par génération du dérivé lithié à partir du composé **3** en présence de deux équivalents de n-butyllithium (le premier équivalent servant à la déprotonation de l'alcool) puis transmétallation avec le chlorure de triméthylétain. Les analyses chromatographiques et par spectrométrie de masse montrent la

formation de produits de dégradation du dérivé iodé, principalement le produit d'hydrolyse du lithien intermédiaire, mais pas du composé stannique attendu. Les différentes conditions testées sont résumées dans le Tableau 14.

Conditions	Observations
Sn_2Bu_6 , $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, toluène, 20 h, 80 °C	Pas de conversion
Sn_2Me_6 , $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, dioxane, 6h, 140 °C, 2,5 bar	Pas de conversion
CoBr_2 , Zn, Me_3SnCl , AllylCl, ACN, 2h	Pas de conversion
1) $n\text{BuLi}$ (2éq), THF, 30 min, -78 °C 2) Me_3SnCl , -78 °C à t.a.	Mélange, hydrolyse du lithien intermédiaire

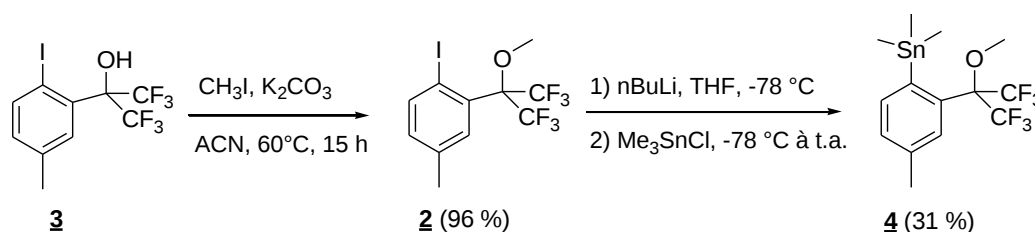
Tableau 14 : Conditions testées pour l'introduction du groupement stannique sur le composé 3.

Ainsi, parmi les différentes voies envisagées, seule la méthode faisant intervenir un intermédiaire lithien montre une conversion du produit iodé de départ. Le produit stannylé désiré n'est toutefois pas obtenu mais il a semblé intéressant d'approfondir plus cette voie en protégeant l'hydroxyle présent à proximité du site de stannylation susceptible de perturber l'étape de transmétallation.

I-1-2. Choix d'un groupement protecteur

Il a été choisi dans un premier temps de protéger l'hydroxyle par le groupement le plus simple et le moins encombrant afin d'évaluer la possibilité d'introduire un groupement stannique sur ce type de composé. Le composé 3 est ainsi protégé sous forme d'éther méthylique en présence d'iodure de méthyle en milieu basique. Le groupement stannique est alors introduit avec succès par l'intermédiaire du dérivé lithié avec un rendement de 31 % (Schéma 3).

Schéma 3 :

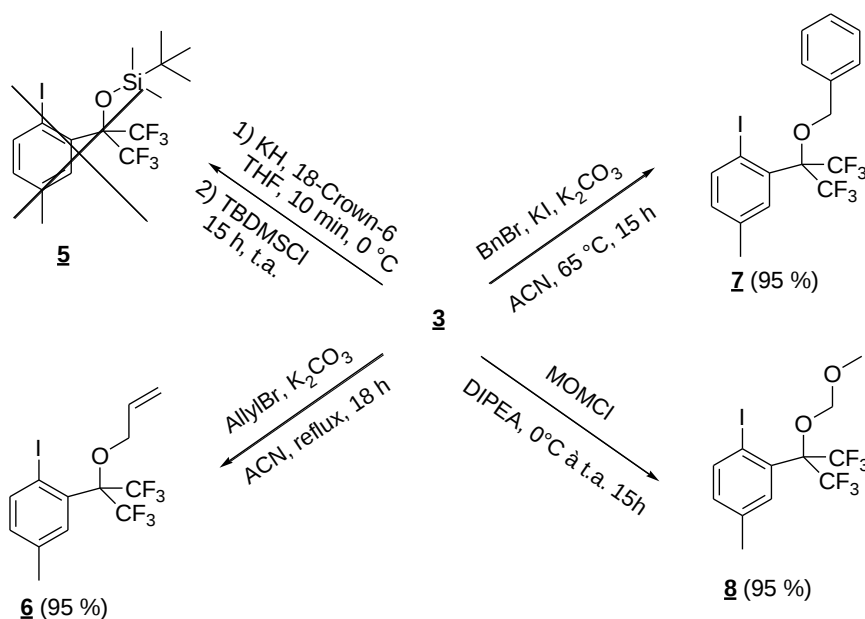


La déprotection d'un hydroxyle protégé par un méthyle est généralement difficile et requiert des conditions non adaptées à la présence d'un groupement organostannique. Les méthodes de déprotection réalisées sur le composé iodé 4 se sont révélées infructueuses (Iodure de triméthylsilyle ou tribromure de bore).

La démonstration ayant été faite qu'il était possible d'introduire un groupement organostannique sur ce type de composé protégé, d'autres groupements protecteurs ont été envisagés. Les groupements de petite taille ont été privilégiés pour limiter la gêne stérique lors de l'étape de stannylation, mais les conditions de déprotection ont également guidé le choix du mode de protection, le groupement stannique devant être préservé lors de celle-ci.

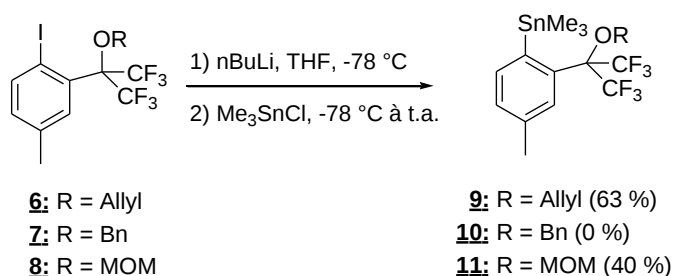
Parmi les nombreux groupements protecteurs connus pour les alcools, quatre ont semblés plus intéressants. Il s'agit du benzyle, de l'allyle, du MOM (méthoxyméthyle) et des éthers silylés. Le groupement benzyle pourra être supprimé par hydrogénation en présence de palladium, la déprotection des allyléthers est décrite en présence de tétrakis(triphénylphosphine)palladium (0) et d'une base de type carbonate¹³¹ et les protections MOM sont clivées en présence d'un acide de Brønsted ou de Lewis. Les éthers silylés peu encombrés tels que le triméthylsilyléther sont relativement peu stables et leur utilisation est assez limitée en synthèse organique. En revanche, les dérivés porteurs de groupements plus encombrants tels que le *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMS) peuvent être avantageusement utilisés et ils seront facilement enlevés en présence de fluorures. Toutefois, les essais réalisés pour introduire le TBDMS n'ont pas fonctionné sur le composé **2**, malgré l'utilisation d'un protocole décrit pour les alcools tertiaires (génération de l'alcoolate en présence d'hydruure de sodium et d'éther couronne puis addition du TBDMSCl¹³²). L'encombrement stérique peut expliquer en partie cet échec, mais la faible nucléophilie de l'alcool due à la forte désactivation des trifluorométhyles y joue également probablement un rôle important. En revanche, les protections benzyle, allyle et MOM sont réalisées dans des conditions standards sans difficultés avec de bons rendements

Schéma 4 :



Les essais d'introduction du groupement stannique ont donc été réalisés sur les composés **6**, **7** et **8** par génération de l'aryllithium puis transmétallation avec le chlorure de trialkylétain. L'introduction est un échec sur le composé **7**, probablement en raison de l'encombrement stérique trop important généré par la protection benzyle. En revanche les composés **6** et **8** ont pu être stannylés avec succès.

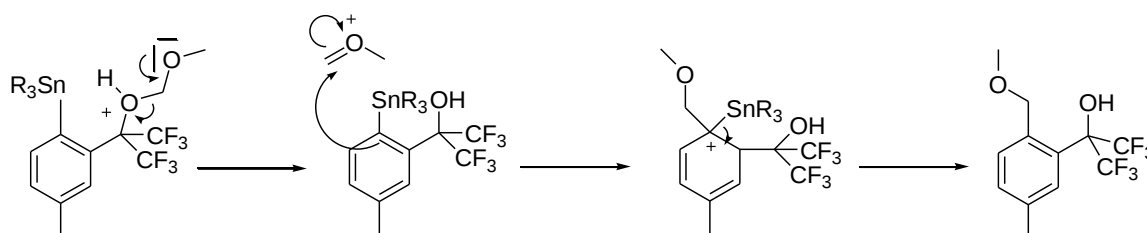
Schéma 5 :



Les conditions de déprotection des composés **9** et **11** ont été préalablement mises au point sur les dérivés iodés **6** et **8** selon les procédures décrites par Vutukuri¹³¹ et Stork¹³³ respectivement. Toutefois, si les déprotections fonctionnent sur les dérivés iodés, aucune conversion n'est observée sur le composé **9** et le composé **11** se dégrade dans les conditions requises.

L'échec de la déprotection du groupement MOM peut s'expliquer par la génération d'un oxonium très électrophile pouvant réagir avec le groupement organique sensible (Schéma 6).

Schéma 6 :



L'emploi d'une méthode alternative faisant intervenir une combinaison acide de Lewis/Nucléophile (TMSCl/Nal) permettant de neutraliser l'oxonium formé¹³⁴ ne permet pas non plus d'obtenir le produit stannylé déprotégé (Tableau 15).

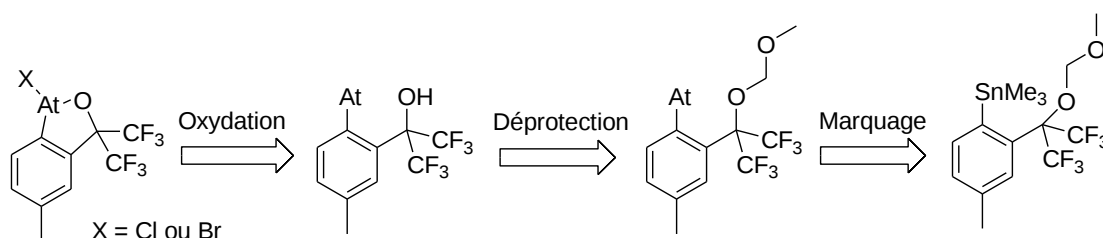
Composé	conditions	Rq
6	$\text{Pd(PPh}_3)_4$, K_2CO_3 , MeOH, rt, 15 h	Rdt = 81 %
9	idem	Pas de conversion
8	HCl, MeOH, 60 °C, 30 min	Rdt = 79 %
11	idem	Déprotection mais dégradation
8	TMSCl, NaI	Rdt = 71 %
11	Idem	Dégradation

Tableau 15 : conditions testées pour la déprotection de l'hydroxyle.

Etant donné que les tentatives de déprotection des composés stannylés se sont révélées infructueuses mais qu'elles fonctionnent sur les dérivés iodés, il a ensuite été envisagé de réaliser le radiomarquage sur un précurseur stannique protégé puis d'effectuer la déprotection dans un second temps. La déprotection la plus simple et la plus rapide à réaliser a été privilégiée en raison des impératifs de temps de manipulation liés à l'utilisation d'un isotope de courte demi-vie tel que l'astate-211. Le composé **8** correspondant le mieux à ces critères, c'est celui-ci qui a été choisi pour la mise au point des radiomarquages.

La nouvelle stratégie de radiomarquage est donc envisagée en trois étapes selon le schéma rétrosynthétique suivant :

Schéma 7 :



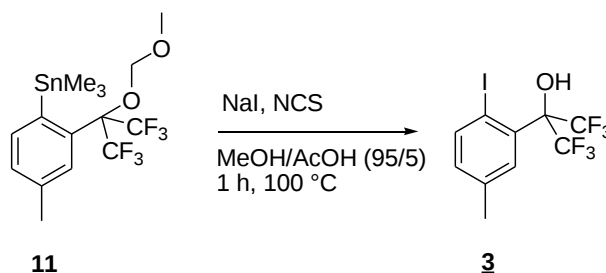
I-2. Synthèse des références iodées froides

L'obtention des composés hypervalents devant s'effectuer en trois étapes (marquage, déprotection puis oxydation) il est nécessaire de disposer des différents intermédiaires iodés froids pour comparaison par chromatographie, seul moyen à disposition pour caractériser les produits radioactifs formés. Les produits iodés **8** et **3** préparés précédemment serviront donc de références analytiques pour l'identification des analogues astatés.

Il est à noter que, dans les conditions de solvant envisagées pour le radiomarquage, l'iododestannylation effectuée préalablement avec de l'iode froid donne directement le

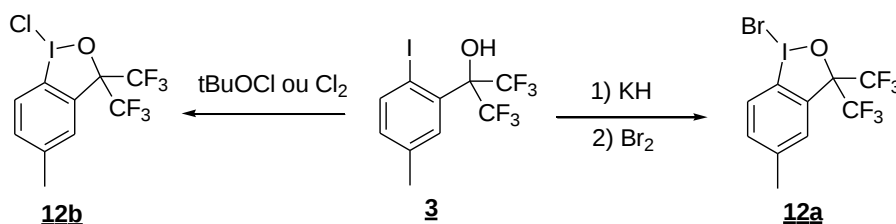
produit iodé déprotégé **3**. La température requise de 100 °C et la présence d'acide acétique dans le milieu permet la déprotection du MOM simultanément avec l'introduction de l'iode (Schéma 8). Le choix de ce groupement protecteur se révèle donc particulièrement adapté puisque qu'une étape de déprotection après radiomarquage, consommatrice de temps, ne devrait pas être nécessaire.

Schéma 8 :



La préparation des composés iodés hypervalents est quant à elle décrite par Amey et Martin selon les méthodes suivantes :

Schéma 9 :



Si les conditions décrites pour la formation des composés **12a** et **12b** sont adaptées à la synthèse organique conventionnelle, elles ne pourront être utilisées dans le cadre de synthèses radiochimiques. Les deux étapes nécessaires pour l'obtention du bromiodane **12a** et la nécessité de conditions anhydres pour l'emploi d'hydruure de potassium sont trop contraignantes et rendent cette méthodologie rédhibitoire. La préparation du chloriodane **12b** par les méthodes décrites poserait également problème. Le *tert*-butylhypochlorite, qui peut être préparé à partir de *tert*-butanol et de dichlore en milieu basique, est sensible et se décompose au stockage. Il devrait donc être préparé avant chaque utilisation pour en disposer avec une pureté reproductible afin de ne pas perturber les réactions effectuées sur de microquantités avec l'astate-211. L'utilisation de chlore gazeux n'est pas non plus adaptée aux conditions de radiomarquage en raison des trop petits volumes nécessaires difficiles à mesurer de façon reproductible. D'autres méthodes permettant de travailler dans les conditions de radiomarquage (petites quantités, microvolumes et temps de réaction courts) ont donc été investiguées.

Formation du bromoiodane 12a

C. Braddock a récemment publié une méthode de préparation d'un bromoiodane similaire (la seule différence avec nos composés étant l'absence de méthyle sur le noyau aromatique), en ajoutant 1 équivalent de N-bromosuccinimide à l'alcool de départ. La réaction est réalisée dans le chloroforme à température ambiante¹³⁵. Ces mêmes conditions ont été testées à partir du composé **3** et la conversion complète en l'espèce hypervalente **12a** est observée en 10 minutes à température ambiante, ce qui est idéal pour des conditions de radiomarquage à l'astate-211.

Schéma 10 :



En raison du succès de cette méthode de formation du bromoiodane, une méthode similaire faisant intervenir la N-chlorosuccinimide pour former l'analogue chloré **12b** a été envisagée. Dans des conditions identiques (1 équivalent de NCS dans le chloroforme à température ambiante), aucune évolution n'est observée. En portant le milieu à reflux pendant 15 heures, la formation du composé d'intérêt est observée, mais la conversion n'est pas complète. En revanche le remplacement du chloroforme par de l'isopropanol plus polaire permet d'obtenir une conversion complète en 30 minutes à 50 °C.

Une méthode alternative a également été testée pour la formation du composé **12b**. Elle consiste à générer du dichlore *in situ* à partir d'hypochlorite de sodium en milieu acide, méthode plus facile à mettre en œuvre que l'utilisation de dichlore gazeux. Réalisée dans l'isopropanol, elle permet d'obtenir une conversion complète en chloroiodane **12b** en 5 minutes à température ambiante.

Les différentes conditions testées pour la formation du composé **12b** sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Conditions	Rendement après purification
NCS, CHCl ₃ , 30 min, t.a.	0 %
NCS, CHCl ₃ , 15 h, reflux	50 %
NCS, iPrOH, 30 min, 50 °C	83 %
NaOCl, HCl, iPrOH, 5 min, t.a.	72 %

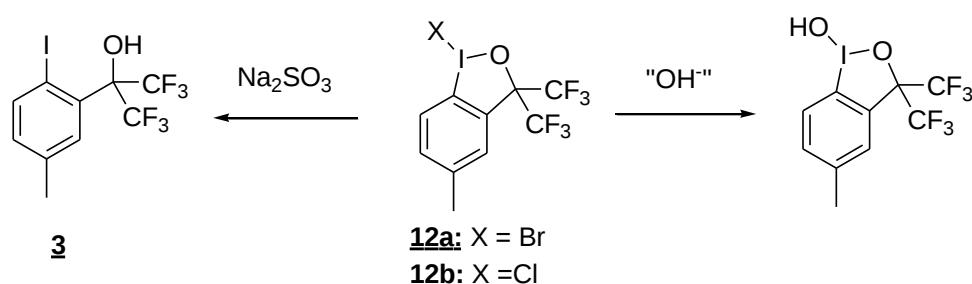
Tableau 16 : Conditions testées pour la formation du chloriodane 12b.

La stabilité des deux iodanes formés a été testée dans plusieurs conditions : en milieu acide (solution d'acide chlorhydrique à pH 2), dans du tampon PBS à pH 7,2 et dans du tampon carbonate à pH 8,6. Les tampons PBS et carbonate sont particulièrement intéressants puisqu'ils correspondent aux milieux utilisés lors du couplage de composés bifonctionnalisés à des protéines. Les résultats présentés dans le Tableau 17 montrent que les iodanes n'évoluent pas après 24 heures en solution acide diluée. Une légère hydrolyse est observée pour le bromiodane dans le PBS (environ 5 %) mais pas pour le chloriodane pouvant mettre légèrement en évidence une stabilité supérieure du chloré. La présence de carbonate conduit toutefois à une hydrolyse plus nette pour les deux formes avec environ 50 % d'iodane de départ intact. Le retour à l'état monovalent est observé en faibles proportions pour le dérivé bromé uniquement.

Composé	Conditions	% intact	% réduit	% hydrolysé
12a	HCl pH = 2	100	0	0
12a	PBS 0,2 M pH 7,2	95	0	5
12a	Tampon carbonate 0,3 M pH 8,6	50	20	30
12b	HCl pH = 2	100	0	0
12b	PBS 0,2 M pH 7,2	100	0	0
12b	Tampon carbonate 0,3 M pH 8,6	50	0	50

Tableau 17 : stabilité des iodanes 12a et 12b dans différentes solutions aqueuses après 24 h à température ambiante.

La réduction vers l'état monovalent s'effectue rapidement pour les deux iodanes lorsque ceux-ci sont placés en milieu réducteur tel qu'une solution de sulfite de sodium. En moins de 5 minutes, les composés 12a et 12b sont réduits sous la forme 3. La réduction et l'hydrolyse en milieu basique des iodanes sont représentées dans le

Schéma 11.Schéma 11 :

I-3. Mise au point du marquage à l'iode-125

L'iode-125 est disponible commercialement sous forme d'iodure de sodium dans de la soude 0,048 N et nécessite l'utilisation d'un oxydant tel que la N-chlorosuccinimide pour obtenir la forme ICl réactive dans l'étape de substitution électrophile aromatique. Les radiomarquages à l'iode-125 des précurseurs stanniques sont généralement réalisés en chloroforme ou en méthanol en présence d'acide acétique¹³⁶. Le méthanol a été privilégié pour la mise au point du radiomarquage à l'iode-125, en vu de la transposition à l'astate-211 car des problèmes de radiolyse peuvent affecter les rendements de radiomarquage lorsque ceux-ci sont réalisés dans le chloroforme¹³⁷. En raison des températures élevées nécessaires pour réaliser le radiomarquage (voir plus bas), et de la réactivité potentielle du méthanol sur certaines fonctions de couplage utilisées ultérieurement, telles que les esters activés envisagés pour le couplage aux anticorps, l'acétonitrile, plus inerte, a également été envisagé comme solvant de radiomarquage.

I-3-1. Iododestannylation avec l'iode-125

Mise au point dans le méthanol :

Les premiers essais d'introduction de l'iode-125 sur le précurseur stannique **11** ont été réalisés en employant 5 équivalents de N-chlorosuccinimide par rapport au précurseur dans un mélange méthanol/acide acétique (95/5). 3,7 MBq (46 pmol) d'iode-125 et 250 nmol de précurseur sont utilisés lors de la réaction. L'iode-125 est donc présent à l'état de traces par rapport au précurseur. La réaction a été réalisée sur 30 min avec des températures variant de 20 à 100 °C. Les analyses par CCM montrent la formation du produit déprotégé **3a** souhaité à partir de 80 °C mais en de très faibles proportions (5 à 10 %). Le reste de l'activité n'apparaît pas sur la CCM indiquant la formation d'un composé volatil indéterminé qui s'évapore après dépôt sur la CCM. Ce composé volatil, qui n'a pu être identifié, pourrait être issu d'une réaction entre l'iode électrophile et un sous-produit du milieu issu de la dégradation du groupement MOM lors de sa déprotection ou avec d'autres impuretés du milieu.

La température de 100 °C a donc été conservée et la cinétique de réaction étudiée. Deux heures sont nécessaires pour former le composé déprotégé avec un rendement de 95 à 98 % (Figure 39).

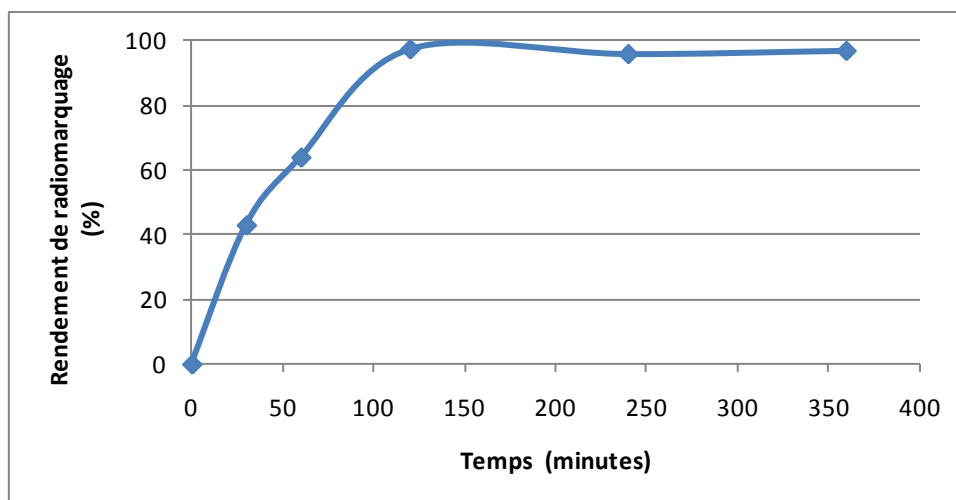


Figure 39 : cinétique de formation du composé **3a** à 100 °C.

Ce résultat montre que le radiomarquage passe probablement par la formation d'un intermédiaire volatil et peu stable qui permet dans un second temps la formation du composé souhaité. Les analyses par CCM et HPLC ont permis d'identifier le produit formé comme correspondant à la référence analytique **3** (Figure 40).

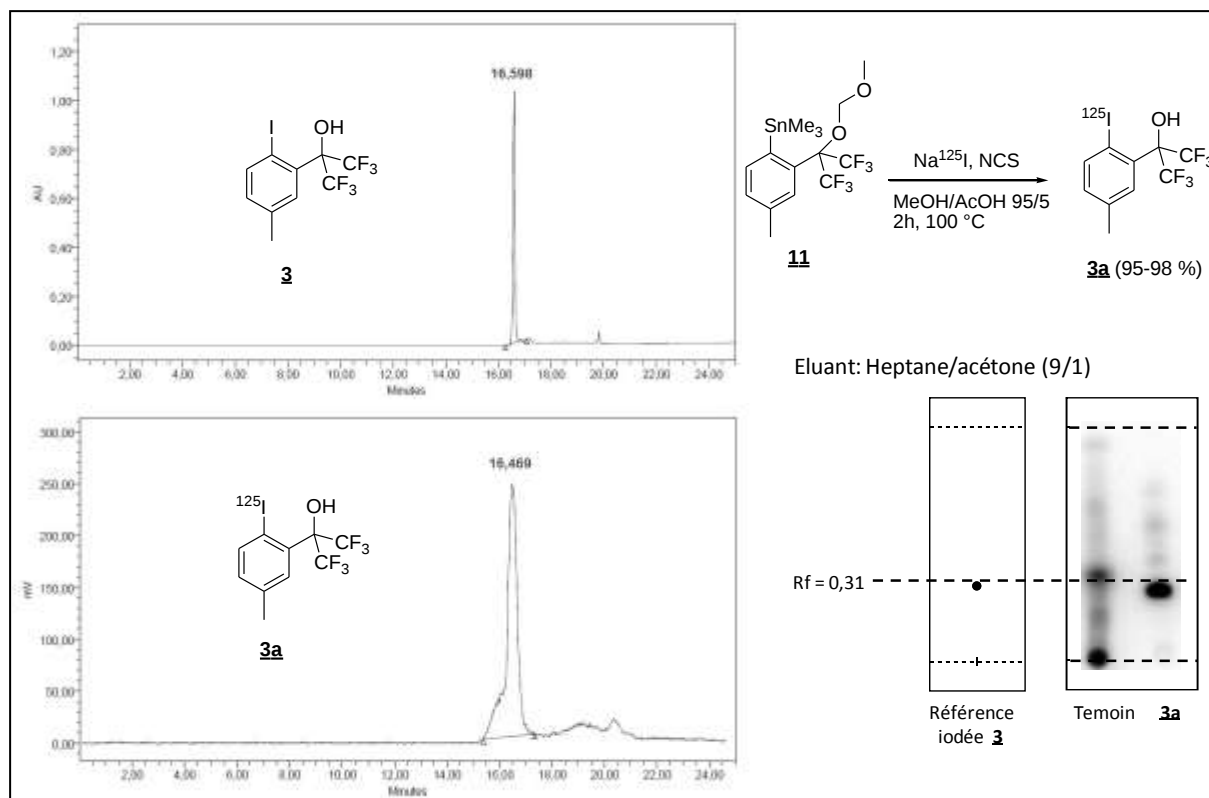


Figure 40 : Analyses chromatographiques de l'étape d'iododestannylation dans le méthanol.

Mise au point dans l'acétonitrile :

Les essais de radiomarquage dans l'acétonitrile ont été réalisés dans les mêmes conditions de température et de concentrations des réactifs, le méthanol étant remplacé par de l'acétonitrile. La réaction a été réalisée en parallèle avec et sans acide acétique afin d'observer la formation ou non des espèces protégées ou déprotégées selon les conditions d'acidité. Deux heures de chauffage à 100 °C conduisent à la formation du composé iodé non déprotégé, qu'il y ait ou non présence d'acide acétique dans le milieu. Le pourcentage d'activité fixé sur la molécule d'intérêt est toutefois faible, le reste correspondant à une forme volatile indéterminée. De plus, le rendement de radiomarquage est plus faible en présence d'acide acétique dans le milieu que lorsque l'acétonitrile est utilisé seul (22% contre 5 %). Ni l'allongement du temps de réaction au-delà 2 h, ni l'augmentation de la température jusqu'à 150 °C ne permettent d'améliorer le rendement de façon significative, un maximum de 29 % étant obtenu pour 3 h à 140 °C. Dans une deuxième étape, l'ajout d'acide chlorhydrique dans le milieu suivi d'un chauffage à 60 °C pendant 30 minutes permet d'observer la formation complète du composé **3a** déprotégé. On note également l'apparition d'activité en pied de CCM correspondant à la conversion du composé volatil en une autre espèce polaire. Une extraction par de l'heptane permet d'isoler le composé **3a** (Figure 41).

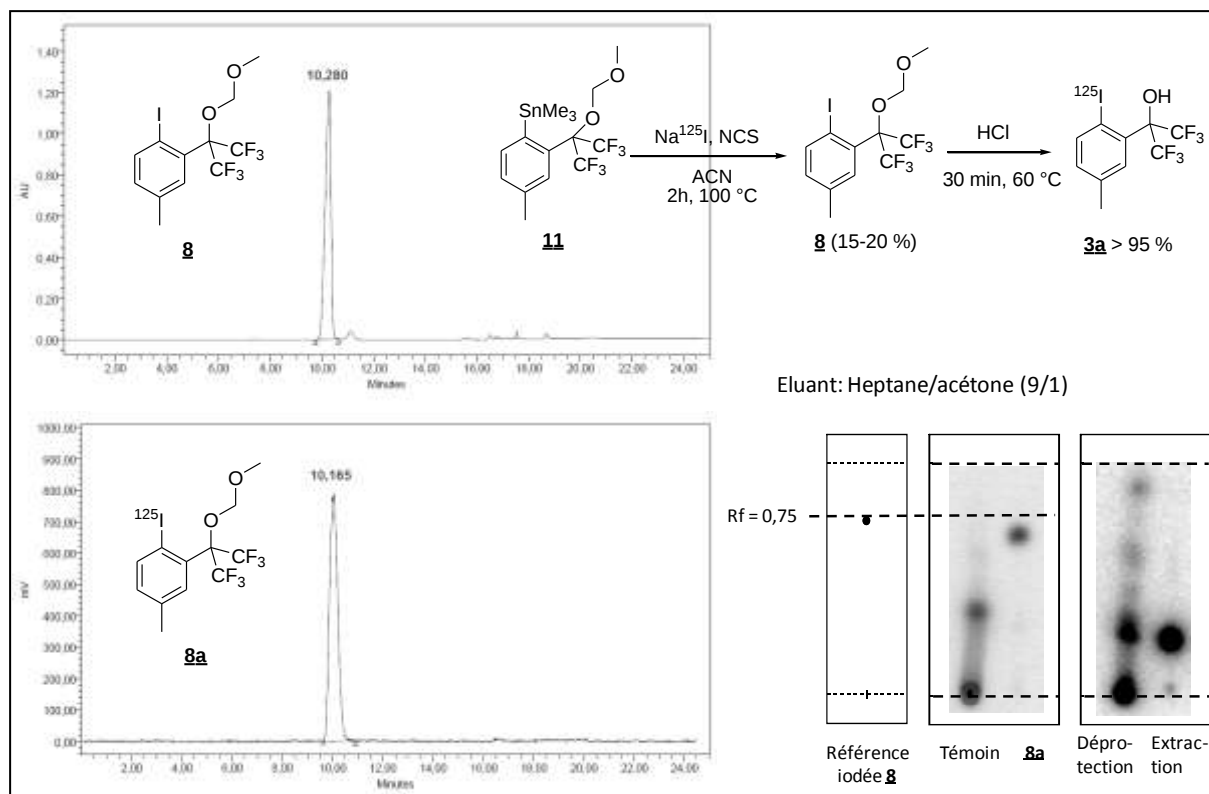


Figure 41 : Analyses chromatographique des étapes d'iododestannylation et de déprotection dans l'acétonitrile. La CCM de la première étape montre que le spot correspondant au produit **8a** est peu intense par rapport au témoin, indiquant une perte de l'activité sur CCM par évaporation. La deuxième CCM montre : à gauche le milieu réactionnel après chauffage en présence d'HCl ; à droite la phase organique extraite après ajout de sulfite de sodium dans le milieu.

L'ensemble des résultats obtenus dans le méthanol et l'acétonitrile montre donc la possibilité d'introduire un isotope de l'iode à l'état de trace sur notre précurseur. Il est ainsi possible d'obtenir le produit directement déprotégé dans le méthanol en présence d'acide acétique en deux heures avec de bons rendements. La formation d'une espèce intermédiaire volatile est observée similairement aux essais réalisés dans le méthanol mais sa nature exacte n'a pu être déterminée à ce jour. Etant donné que les solutions témoins (de compositions identiques aux solutions de marquage excepté l'absence de précurseur) préparées en parallèle des radiomarquages ne conduisent pas à la formation d'espèces volatiles, il a été conclu que le précurseur en était l'origine. D'abord suggérée comme pouvant provenir d'un sous produit issu de la déprotection du MOM, cette espèce pourrait également provenir de la présence d'un contaminant non détecté présent en traces avec le précurseur. Cette seconde hypothèse nous a semblé plausible en raison du fait que lors du marquage effectué dans l'acétonitrile - conditions dans lesquelles aucune déprotection n'est observée – un phénomène similaire apparaît avec formation d'une espèce volatile conduisant à de faibles rendements. Toutefois, des purifications supplémentaires du précurseur par HPLC ne permettent pas l'obtention de meilleurs résultats. L'analyse par

HPLC du milieu réactionnel contenant cette espèce volatile ont montré qu'il s'agit d'un composé très peu polaire sortant avec le pic d'injection lors de l'élution en phase normale avec de l'heptane. Des analyses plus poussées sont donc nécessaires et l'utilisation d'un système chromatographique couplé à une détection par ICP-MS pourrait fournir des indications supplémentaires sur la nature de ce composé.

I-3-2. Formation des composés hypervalents

Formation du [125I]-bromoiodane 12c :

La formation de l'espèce hypervalente bromée a principalement été étudiée à partir des solutions obtenues lors de l'étape d'iododestannylation en méthanol. La N-bromosucinimide a été ajoutée au composé **3a** en solution ou après évaporation. L'ajout de NBS en solution dans le chloroforme ou dans l'isopropanol donne des résultats peu reproductibles pour les différentes conditions testées (à température ambiante et en chauffant jusqu'à 60 °C sur des durées allant jusqu'à 60 minutes). L'obtention de résultats beaucoup plus reproductibles a été rendue possible grâce à l'ajout d'acide chlorhydrique dans le milieu. La conversion du composé **3a** en l'espèce hypervalente **12c** est ainsi quasiment totale et reproductible en ajoutant la NBS en solution dans le chloroforme, de l'acide chlorhydrique et en chauffant 15 min à 60 °C. L'identité du produit radioactif obtenu a été confirmée par CCM et HPLC (Figure 42). De plus, l'ajout de métabisulfite de sodium sur le bromoiodane formé permet d'observer le retour à l'état monovalent apportant ainsi une seconde preuve de la nature du composé.

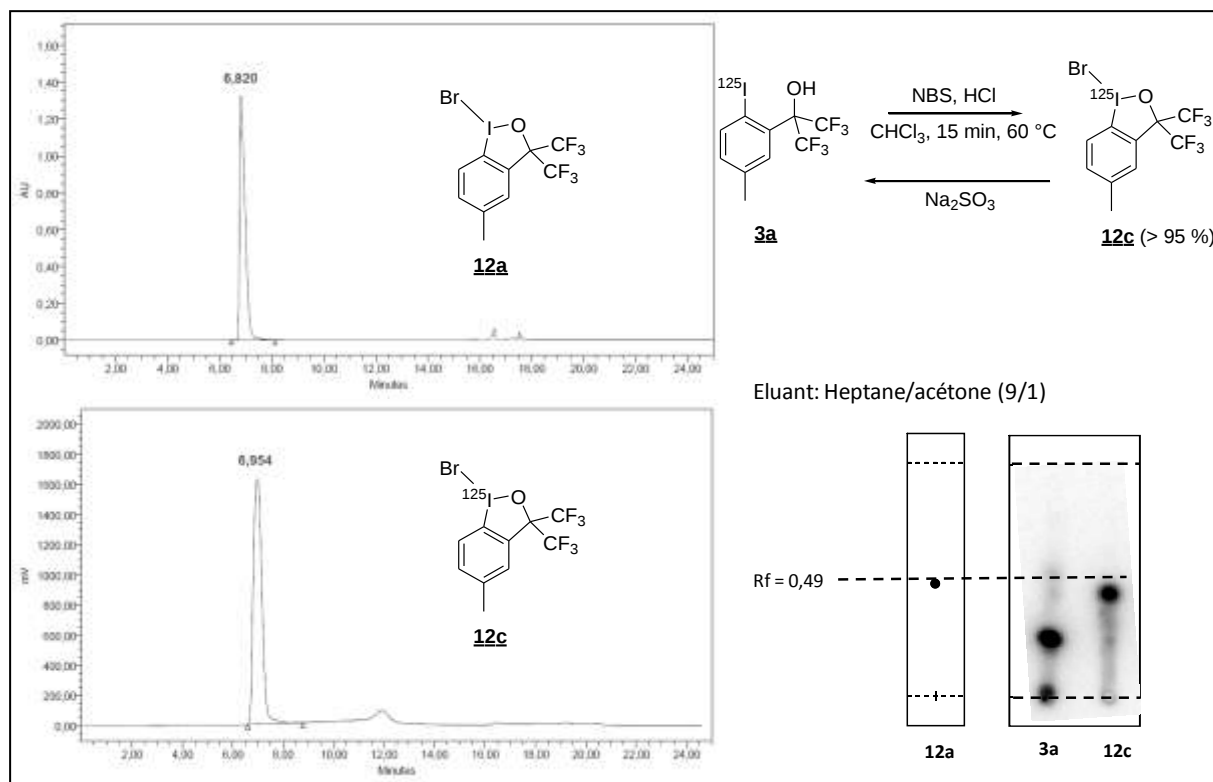


Figure 42 : Analyses chromatographiques de la formation du bromoiodane **12c**.

Formation du [125I]-chloroiodane **12d** :

Les deux méthodes ayant permis l'obtention du chloroiodane froid **12b** ont été évaluées. Alors que l'ajout de NCS en solution dans l'isopropanol au composé **3a** ne montre aucune évolution, même par chauffage jusqu'à 100 °C, le second système employant le couple HCl/NaOCl permet d'obtenir une conversion complète en 15 minutes à température ambiante. La réduction par le sulfite de sodium est également observée (Figure 43).

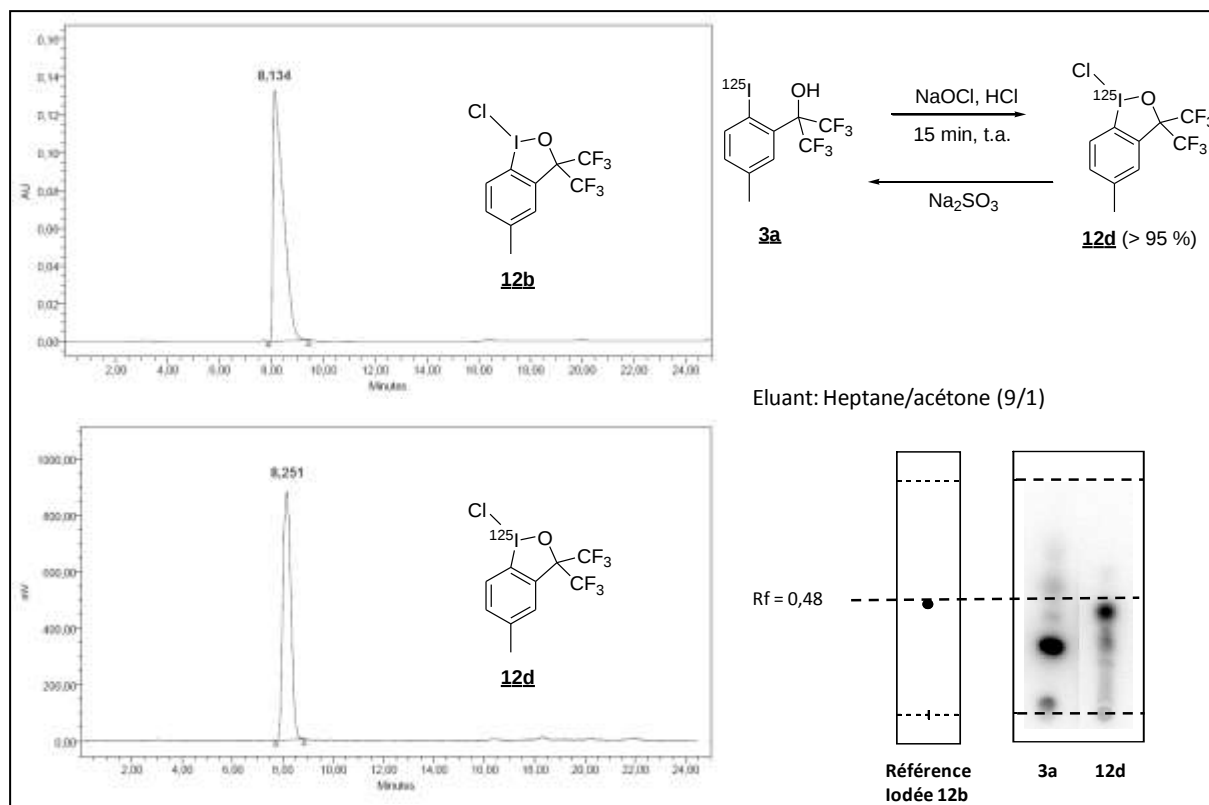


Figure 43 : Analyses chromatographiques de la formation du chloroiodane **12d**.

I-4. Marquage à l'astate-211

Les premiers essais de radiomarquages ont été réalisés avec de l'astate-211 extrait d'une cible de bismuth par voie humide, seule méthode d'extraction disponible alors au laboratoire. S'ils ont permis d'observer quelques résultats intéressants, des limitations d'utilisation sont rapidement apparues, notamment à cause de la présence d'acide nitrique en concentration élevée dans la solution d'extraction de l'astate conduisant à la dégradation des composés formés. La mise au point d'une méthode d'extraction par distillation sèche permettant de s'affranchir de la présence d'acide nitrique dans le milieu a par la suite permis l'obtention de meilleurs résultats. Les données obtenues par ces deux méthodes d'extraction sont présentées ci-dessous.

I-4-1. Radiomarquage par voie humide (avec de l'astate-211 obtenu par extraction liquide/liquide)

I-4-1-1. Description de la méthode d'extraction

Les cibles de bismuth ont été préparées au laboratoire Subatech à l'école des mines de Nantes puis irradiées au cyclotron CNRS-CEMHTI d'Orléans selon la réaction nucléaire $^{209}\text{Bi} (\alpha, 2n) ^{211}\text{At}$. Le support de cible est en cuivre sur lequel une couche de bismuth-209 fondu est déposée avec une épaisseur de 240 μm (Figure 44). Durant l'irradiation, les particules alpha sont accélérées à 28 MeV avec une intensité de 2 μA pendant deux heures. A l'issue de l'irradiation, l'activité d'astate-211 produite est d'environ 100 MBq. Après transport jusqu'à notre laboratoire à Nantes, et compte tenu de la demi-vie de 7,21 h de l'astate-211, environ 50 MBq sont disponibles avant extraction.

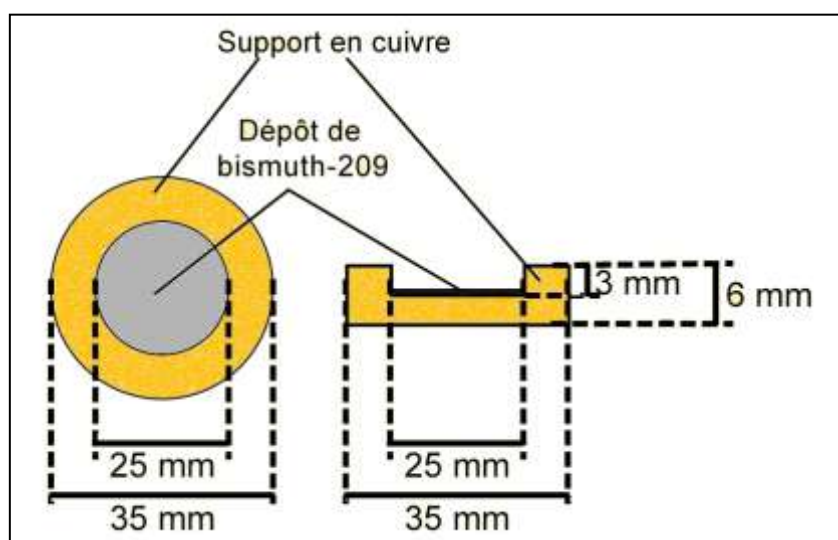


Figure 44 : caractéristiques de la cible de bismuth-209 sur support en cuivre utilisée pour la voie humide.

La méthode d'extraction de l'astate-211 a été mise au point en collaboration avec le laboratoire Subatech de l'école des Mines de Nantes^{138, 39}. Elle consiste à attaquer la cible à l'acide nitrique 65 %. Cette opération est effectuée à 4 reprises afin de dissoudre la totalité du bismuth contenant l'astate-211. Les quatre fractions d'acide nitrique sont rassemblées et évaporées à sec. Le résidu est repris dans de l'acide nitrique dilué et l'activité extraite deux fois par de l'éther diisopropylique. Cette méthode permet d'extraire 90 % de l'activité en 1h15 environ (Figure 45).

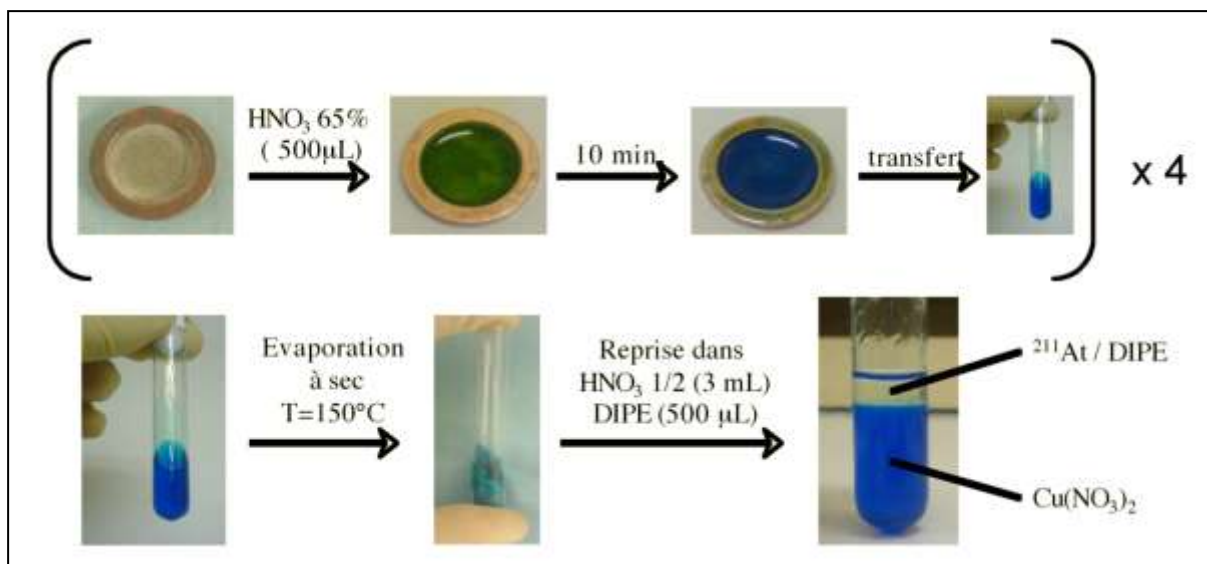
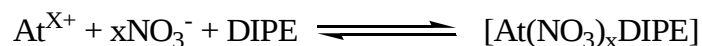


Figure 45 : Protocole d'extraction par voie humide.

Le choix de couple éther diisopropylique (DIPE)/HNO₃ comme système biphasique se justifie par différents facteurs :

- **Le DIPE** permet la complexation de l'astate grâce à ses deux doublets non liants, sa polarité favorable et son point d'ébullition relativement bas (68 °C) le rendent plus adapté que d'autres éthers similaires.



- **L'acide nitrique** est en partie extrait dans le DIPE. D'autres acides tels que l'acide chlorhydrique ou l'acide perchlorique pourraient être utilisés pour s'affranchir de ce problème. Cependant, seul HNO₃ permet de minimiser l'extraction par le DIPE du cuivre et d'impuretés radionucléidiques issues de l'activation du support de cuivre (notamment le gallium-67 et le zinc-65).

Après extraction, seule la première fraction de DIPE est conservée pour nos expérimentations. L'astate-211 disponible est donc en solution dans l'éther diisopropylique (40 MBq environ dans 500 µL), mais la solution contient également de l'acide nitrique à hauteur de 3,1 mol/L, inconvénient qu'il conviendra de prendre en compte lors des radiomarquages. Les analyses par spectroscopie réalisées au laboratoire Subatech montrent l'absence des impuretés détectables avant extraction (Ga-67, In-111, Bi-207 et Zn-65) et les données obtenues par ICP-MS après décroissance radioactive indiquent l'absence de métaux dans la solution de DIPE.

I-4-1-2. Radiomarquage du précurseur

Les conditions nécessaires au radiomarquage d'un organostannique précurseur du SAB ont récemment été optimisées au laboratoire avec de l'astate-211 obtenu par voie humide par Mickaël Bourgeois lors de ses travaux de thèse³⁹. Elles ont servi de base à la mise au point du marquage de notre précurseur (composé **11**). Ainsi, les meilleures conditions décrites correspondent à l'utilisation de 20 nmol de précurseur et 100 nmol de NCS pour 50 μ L d'astate-211 en DIPE (environ 4 MBq). Des rendements d'environ 85 % sont obtenus en 15 min (Figure 46).

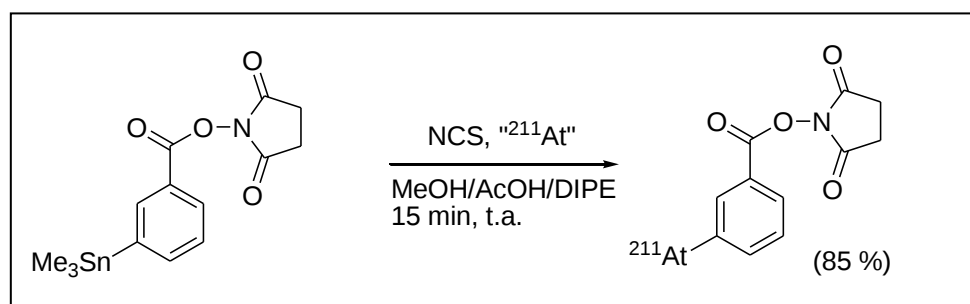


Figure 46 : synthèse du SAB optimisée pour la voie humide.

Il est à noter que l'utilisation d'un oxydant (en l'occurrence la N-chlorosuccinimide) s'était révélée indispensable pour observer l'introduction de l'astate-211 sur le précurseur. Ceci est surprenant étant donné les conditions oxydantes auxquelles est soumis l'astate-211 lors de l'extraction (acide nitrique concentré et chauffage). Dans ces conditions, les données de la littérature concluent à la formation d'espèces de l'astate complexées à l'éther diéthylique dans des états d'oxydations supérieurs (+III ou +V selon les publications^{43,38}). Une explication quant à la réussite du radiomarquage serait la formation d'espèces réductrices issues de la dégradation du solvant par radiolyse (radical hydrogène $\text{H}^\cdot$, isopropanol excité $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}^*$, acétaldéhyde CH_3CHO et acétone $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$). Dans ces conditions, l'astate est susceptible d'être réduit à l'état d'oxydation $-I$, d'où la nécessité de le réoxyder pour effectuer la réaction d'astatodéstannylation.

Cette modification de l'état de l'astate-211 au cours du temps est mise en évidence par l'analyse sur CCM de la solution d'astate-211. Elle montre le passage d'une forme de l'astate polaire en pied de CCM après extraction vers une forme apolaire migrant avec le front de solvant (Figure 47). Ce phénomène fait probablement partie des facteurs pouvant causer les problèmes de reproductibilité observés lors des radiomarquages effectués avec cette méthode.

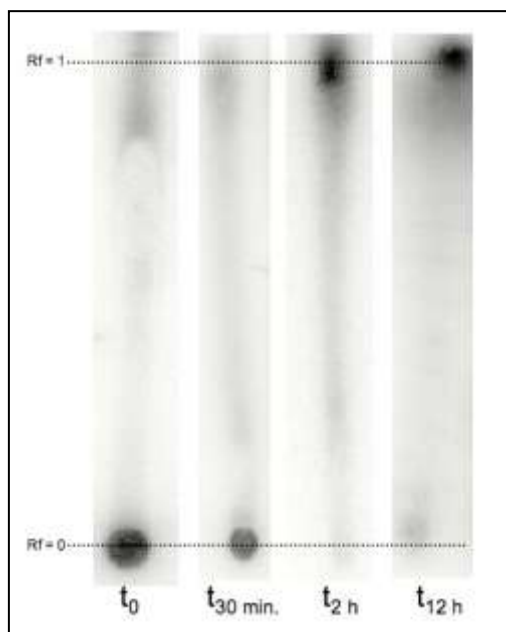


Figure 47 : Evolution d'une solution d'astate-211 extraite par voie humide en DIPE au cours du temps. Environ 90 % d'une forme apolaire migrant avec le front de solvant sont formés après 2 heures.

Les essais effectués dans ces conditions sur notre précurseur **11** avec des températures allant de 20 à 100 °C montrent que, pour la température la plus basse employée, le radiomarquage fonctionne avec 10 à 15 % de l'activité sous forme d'un composé dont le rapport frontal en CCM est inférieur mais proche du composé iodé de référence **3**. Le reste de l'activité n'apparaît pas sur la CCM, indiquant la formation d'un composé volatil, comme lors des marquages à l'iode-125. Lorsque la température est augmentée, un meilleur taux de substitution de l'astate-211 est obtenu, mais un mélange complexe est observé sur CCM, correspondant probablement à une dégradation du produit sous l'action de l'acide nitrique présent en grande concentration. L'ajout de NBS en solution dans l'isopropanol suivi d'un chauffage pendant 30 minutes à 60 °C montre la formation d'un produit moins polaire au rapport frontal sur CCM également inférieur au bromiodane **12a** (Figure 48). La formation du chloriodane **12f** n'a été testée qu'avec l'utilisation de NCS uniquement. Comme avec l'iode-125, aucune conversion n'est observée avec cet oxydant.

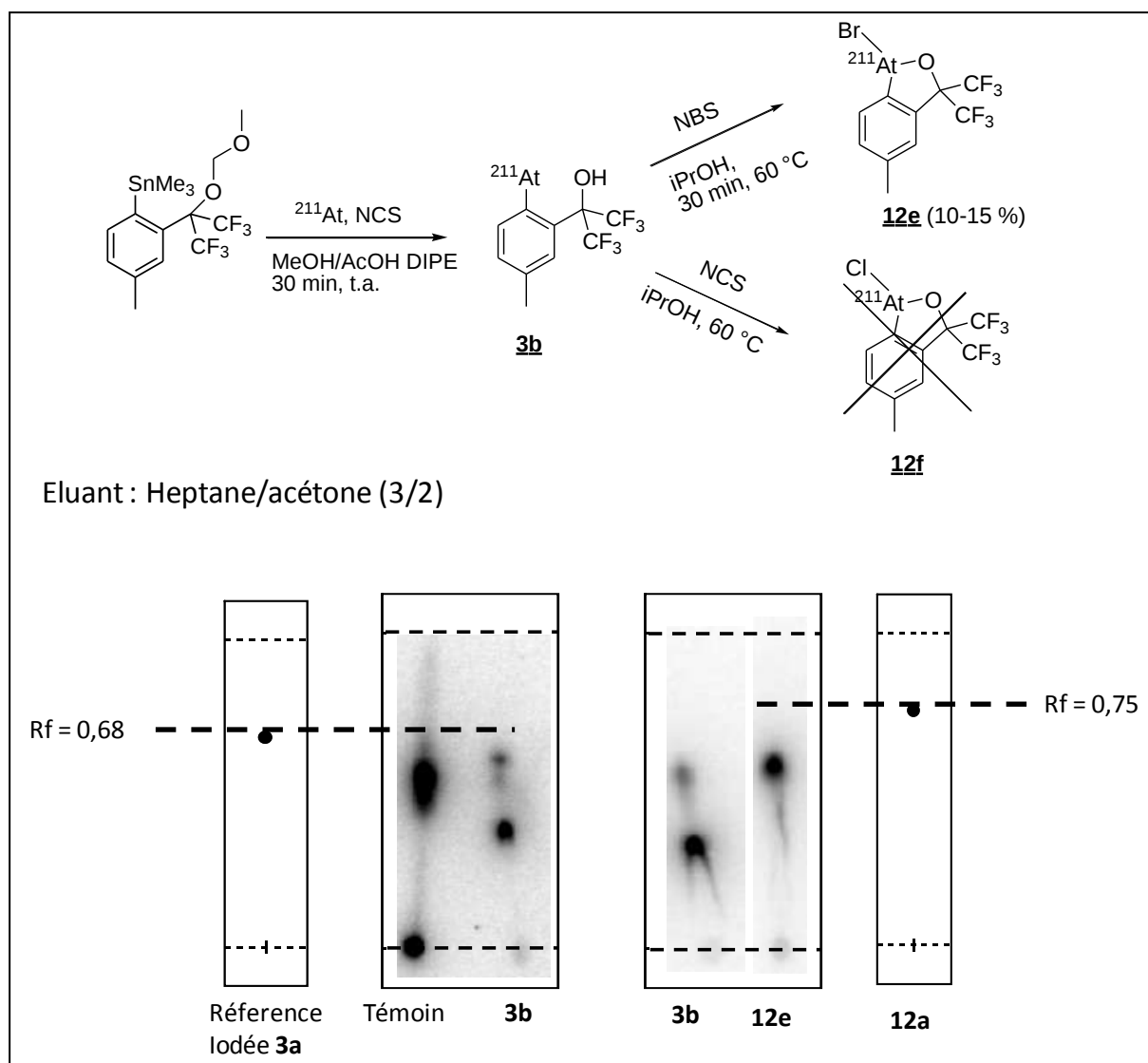


Figure 48 : Analyses chromatographiques de la formation de bromoastatane **12e**. Les conditions testées pour la formation du chloroastatane **12f** ne permettent pas la formation du composé attendu.

Ces résultats montrent que si l'introduction de l'astate-211 sur le précurseur et la formation de l'hypervalent semblent bien se produire, une altération du composé formé conduit cependant à l'obtention d'un dérivé plus polaire non identifié. Les conditions acides imposées par la méthode d'extraction ne semblant pas favorable à l'étude de nos composés, nous avons dans un second temps privilégié le développement de la méthode d'extraction de l'astate-211 par distillation permettant de s'affranchir de ces inconvénients

I-4-2. Radiomarquage par voie sèche (avec de l'astate-211 obtenu par distillation)

I-4-2-1. Mise en place de la méthode au laboratoire

La voie sèche a rapidement semblé une solution indispensable pour s'affranchir des limitations rencontrées avec la voie humide. Elle présente l'avantage de permettre la distillation de l'astate-211 depuis la cible vers le solvant de son choix impliquant un meilleur contrôle de la pureté des solutions utilisées. Elle est toutefois plus difficile techniquement à mettre en œuvre et elle nécessite un équipement spécifique pour sa réalisation. Le principe de la voie sèche consiste à chauffer la cible au-delà du point d'ébullition de l'astate-211 et d'entraîner les vapeurs jusqu'au solvant de récupération à l'aide d'un flux gazeux (principe général présenté précédemment en page 33).

Il n'existe pas de matériel standard pour la distillation de l'astate-211, chaque laboratoire a donc conçu son propre système. L'équipement nécessaire est constitué d'un four capable de monter à des températures supérieures à 650 °C, de pièces de verrerie spécifiquement préparées pour accueillir la cible et permettre la collecte de l'astate-211 en sortie de four, d'un système de pompage pour générer le flux de gaz dans le four et d'un système de mesure de suivi de l'activité collectée. Ce système étant déjà en place depuis de nombreuses années au MHH (Medizinische Hochschule Hannover) à Hanovre en Allemagne, les principaux éléments, dont les dimensions de la verrerie, ont été repris à l'identique afin de faciliter la mise au point de la distillation dans notre laboratoire (Figure 49).

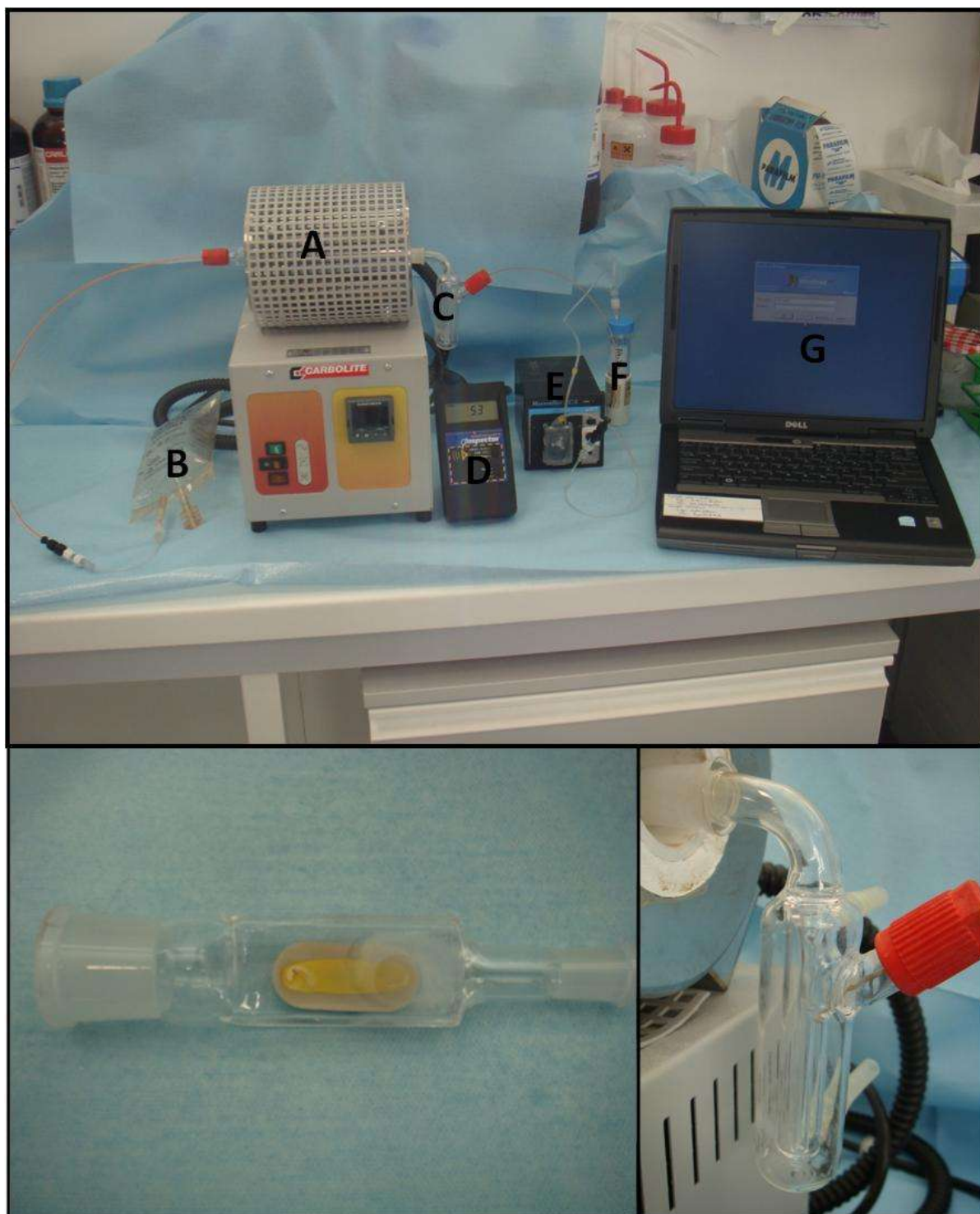


Figure 49 : En haut : Système de distillation de l'astate-211 mis en place dans notre laboratoire. (A) Four réglable jusqu'à 1000 °C contenant la cible placée sous flux d'azote dans un support en quartz. (B) Réserve d'azote. (C) Collecteur. (D) Compteur Geiger permettant un suivi de l'activité dans le collecteur. (E) Pompe péristaltique. (F) Piège contenant du sulfite de sodium 2M. (G) Suivi et enregistrement de l'activité relevée sur le compteur Geiger. En bas à gauche, cible d'astate dans son support en quartz avec l'entrée d'azote côté gauche et la sortie côté droit. La photo a été prise après distillation, le bismuth, oxydé apparaît en jaune. En bas à droite : collecteur en sortie de four. Il est constitué de deux enveloppes, l'enveloppe interne contient le solvant dans lequel le flux gazeux bulle lors de la distillation. Un courant de liquide réfrigéré à 0 °C circule dans l'enveloppe externe pour maintenir le solvant à basse température à proximité du four.

Les dimensions des cibles d'astate-211 conçues par le CEMHTI d'Orléans pour la voie humide n'étant pas adaptées à la taille de la verrerie du four, de nouvelles cibles ont dû être employées. Leur taille a été adaptée à celle du support en quartz et le cuivre a été remplacé par du nitrure d'aluminium dont le coût à l'usinage est moins élevé mais dont les propriétés de conductivité thermique nécessaires au refroidissement de la cible pendant l'irradiation restent très bonnes ($170\text{--}190 \text{ W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$ pour le nitrure d'aluminium fourni par la société MICROCERTEC, Collegien-FRANCE). Le dépôt de bismuth est obtenu par évaporation du bismuth-209 sous vide avec une épaisseur de $25 \mu\text{m}$ (Figure 50). Durant l'irradiation, les particules alpha sont accélérées à $28,8 \text{ MeV}$ avec une intensité comprise entre $1,7$ et $2,5 \mu\text{A}$ sur une durée variant de 2h00 à 2h45. À l'issue de l'irradiation, l'activité d'astate-211 produite varie de 140 à 317 MBq. Après transport jusqu'à notre laboratoire à Nantes, et compte tenu de la demi-vie de $7,21 \text{ h}$ de l'astate-211, environ 80 à 180 MBq sont disponibles avant extraction.

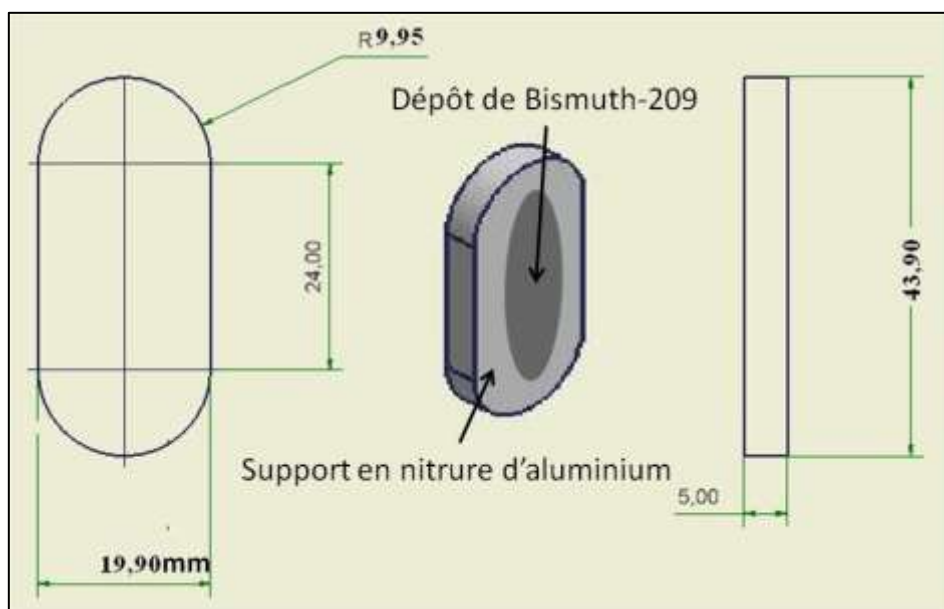


Figure 50 : Caractéristiques des supports en nitrure d'aluminium utilisés pour la voie sèche.

Les conditions de distillation ont dans un premier temps été reproduites à l'identique de celles mises en place au MHH à Hanovre en raison des dimensions similaires de la verrerie. La distillation est donc opérée sous un flux d'azote réglé à $3,5 \text{ mL/min}$ et une montée en température du four de $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ à $900 \text{ }^{\circ}\text{C}$ sur une vingtaine de minute. $500 \mu\text{l}$ de méthanol sont placés dans le collecteur en sortie de four. Le débit d'azote est un facteur important puisque s'il est trop faible, il est insuffisant pour entraîner l'astate-211 en sortie de four, mais s'il est trop élevé, une proportion trop importante est entraînée au-delà du solvant de recondensation, vers le piège contenant le sulfite de sodium placé après la pompe.

Le rendement d'extraction obtenu dans ces conditions est très faible par rapport à celui obtenu sur le montage du MHH (environ 15 % d'astate-211 en solution contre 80 à 90 %), la plus grande partie de l'activité étant concentrée sur les parois de la verrerie dans les premiers centimètres en sortie de four avant d'atteindre le solvant. Une augmentation du débit d'azote à 7 mL/min permet d'atteindre un rendement de 30 % encore insuffisant.

L'explication de cette différence de résultats malgré l'utilisation de paramètres identiques pourrait être la différence entre les cibles utilisées. Alors qu'au MHH le bismuth-209 est déposé sur un support en aluminium, les cibles irradiées au cyclotron du CEMHTI sont sur un support en nitrure d'aluminium. Ce matériau est poreux, il peut donc absorber de l'eau de refroidissement lors de l'irradiation. Ceci a été confirmé visuellement lors de la réception de certaines cibles au laboratoire qui paraissaient très humides.

Afin d'éliminer toute perturbation due à l'eau absorbée par la cible, des essais de distillation avec un séchage préalable de la cible ont été réalisés. Pour cela, la cible est placée dans le four sous flux d'azote (débit à 7 mL/min) et la température portée à 200 °C pendant 30 min. Après rinçage du collecteur au méthanol pour éliminer les traces d'eau résiduelles, la distillation est opérée de façon habituelle avec un débit d'azote fixé à 7 mL/min. Dans ces conditions, les rendements d'extraction obtenus sont conformes à ceux observés au MHH avec la majorité de l'activité présente dans la solution en sortie de four. Après prélèvement de la solution d'astate-211, un rinçage du collecteur avec 500 µL de méthanol permet de récupérer une partie de l'activité adsorbée sur les parois en verre. Des rendements d'extraction allant jusqu'à 90 % de l'astate-211 dans environ 1 mL de méthanol ont ainsi pu être obtenus.

Le protocole retenu pour les distillations est donc le suivant :

- 1) **Séchage de la cible:** placer la cible dans le four dans son support en quartz et 500µL de méthanol dans le collecteur et chauffer à 200°C pendant 30 minutes sous flux d'azote (7ml/min) sans réfrigérant. Rincer le collecteur avec le méthanol et cette solution de rinçage (activité comptée nulle). Rincer avec 500 µL de méthanol supplémentaires.
- 2) **Distillation :** Placer 500 µL de méthanol dans le collecteur, régler le réfrigérant sur 0°C et porter le four à 900 °C sous flux d'azote (7 mL/min). L'activité au niveau du collecteur commence à monter vers 630 °C, le four peut être arrêté lorsque le pallier indiquant la fin de la distillation est atteint. Celui-ci survient entre 20 et 25 min après le début de la distillation (Exemple en Figure 51).

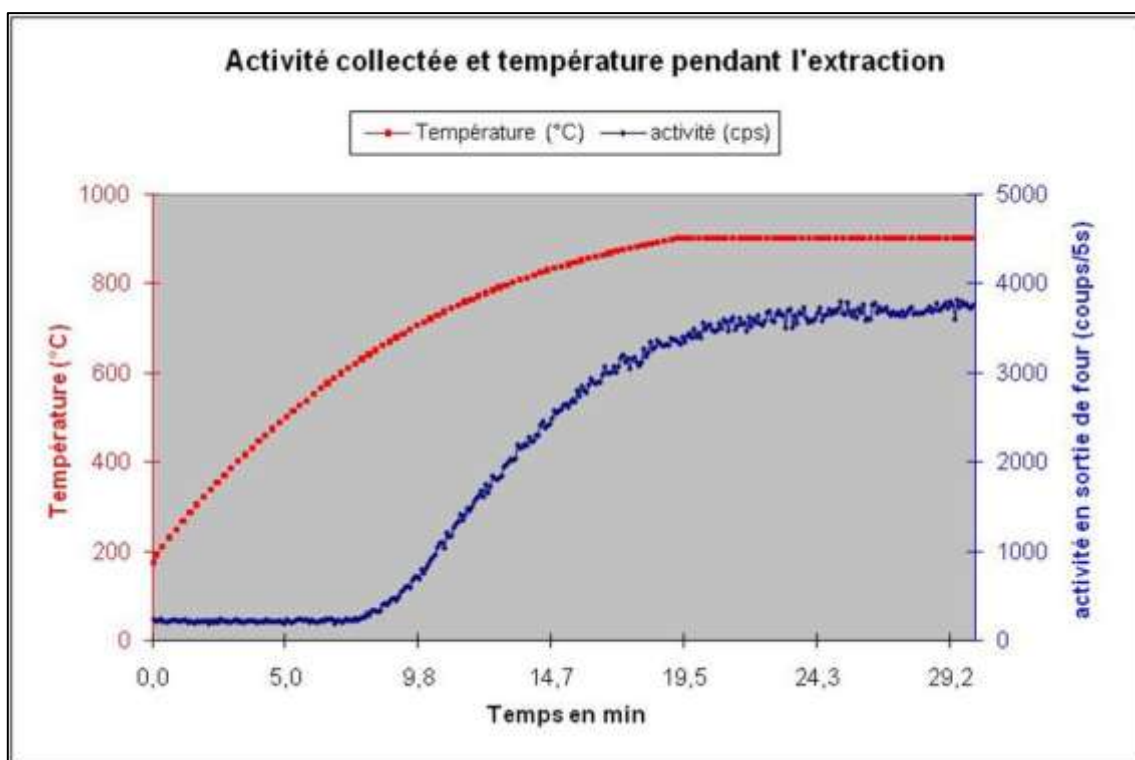


Figure 51 : Suivi de température et d'activité pendant la distillation de l'astate-211.

- 3) **Collecte de l'activité :** déconnecter le collecteur du four pour l'isoler de la chaleur, rincer le conduit en verre avec le méthanol présent et prélever cette solution. Rincer le collecteur avec 500 μ L supplémentaire et les prélever.

Le bilan des activités récupérées lors de la douzaine de cibles traitées dans ces conditions est résumé dans le tableau 18.

Localisation de l'activité d'At-211	Pourcentage de l'activité totale
500 μ L de méthanol (bullage durant distillation)	65 $\pm$ 10 %
500 μ L de méthanol (rinçage après distillation)	13 $\pm$ 4 %
Piège à sulfite de sodium 2M	1 à 2 %
Restant dans le collecteur	15 à 20 %

Tableau 18 : localisation de l'astate-211 après distillation.

Cette méthode d'extraction de l'astate nous a permis d'obtenir des activités variant de 49 à 128 MBq dans environ 1 mL de méthanol en 1h15 à 1h30 de manipulation. Le séchage de la cible avant distillation, même s'il fait perdre 30 minutes, a permis d'obtenir des

rendements de 80 % en moyenne. Il est à noter que les différents paramètres n'ont pas été optimisés (en particulier le débit d'azote et la durée de préséchage de la cible). Nous avons dans un premier temps préféré conserver les premières conditions ayant donné des rendements acceptables pour les radiomarquages à réaliser, et ce en raison du nombre très limité de cibles d'astate-211 disponible.

Lors des distillations effectuées sur ce système, seul le méthanol a été employé, mais d'autres solvants pourront être également utilisés selon les besoins. Certaines expérimentations décrites dans les pages suivantes ont été réalisées à partir d'astate-211 dans l'acétonitrile. Dans ces cas précis, les distillations et les radiomarquages ont été réalisés au MHH à Hanovre.

I-4-2-2. Radiomarquage : étape d'astatodéstannylation

Mise au point dans le méthanol :

Les premiers essais de radiomarquage ont été réalisés en reprenant les meilleures conditions obtenues pour le radiomarquage du SAB étudié dans un premier temps par la voie sèche (10 nmol de précurseur, 50 nmol de NCS pour environ 5 MBq d'astate-211 dans un volume final de 57 μ L de MeOH/AcOH 95/5). Les premiers essais ont donc été effectués sur 30 minutes avec des températures comprises entre 50 et 100 °C. Ils montrent deux différences par rapport aux résultats à l'iode-125. Tout d'abord, si la température optimale s'avère être là aussi de 100 °C, la réaction est complète dès 30 minutes d'incubation (contre près de 2 h pour l'iode-125). De plus, on n'observe pas de formation d'un produit volatil pour la fraction d'activité non incorporée au précurseur lors de réactions à plus basse température, celle-ci étant visible sur les CCM. Ceci montre donc une différence de réactivité de l'astate-211 par rapport à l'iode-125. Une explication pourrait être l'impossibilité pour l'astate-211 de former cette espèce volatile, le rendant alors plus disponible pour la substitution sur le précurseur. Une autre hypothèse serait que, si cette espèce volatile est formée, elle est beaucoup moins stable que la forme iodée et conduit ainsi plus rapidement à la libération d'astate réactif pour la substitution.

Différents paramètres ont ensuite été optimisés, dont la quantité de précurseur et d'oxydant, la température et la durée de réaction. Les concentrations initiales présentées ci-dessus sont avérées être celles donnant les meilleurs résultats avec des rendements de l'ordre de 95 % après 30 minutes à 100 °C. Le rapport frontal sur CCM du produit formé correspond à celui observé pour le dérivé iodé, tout comme le temps de rétention en HPLC (Figure 52).

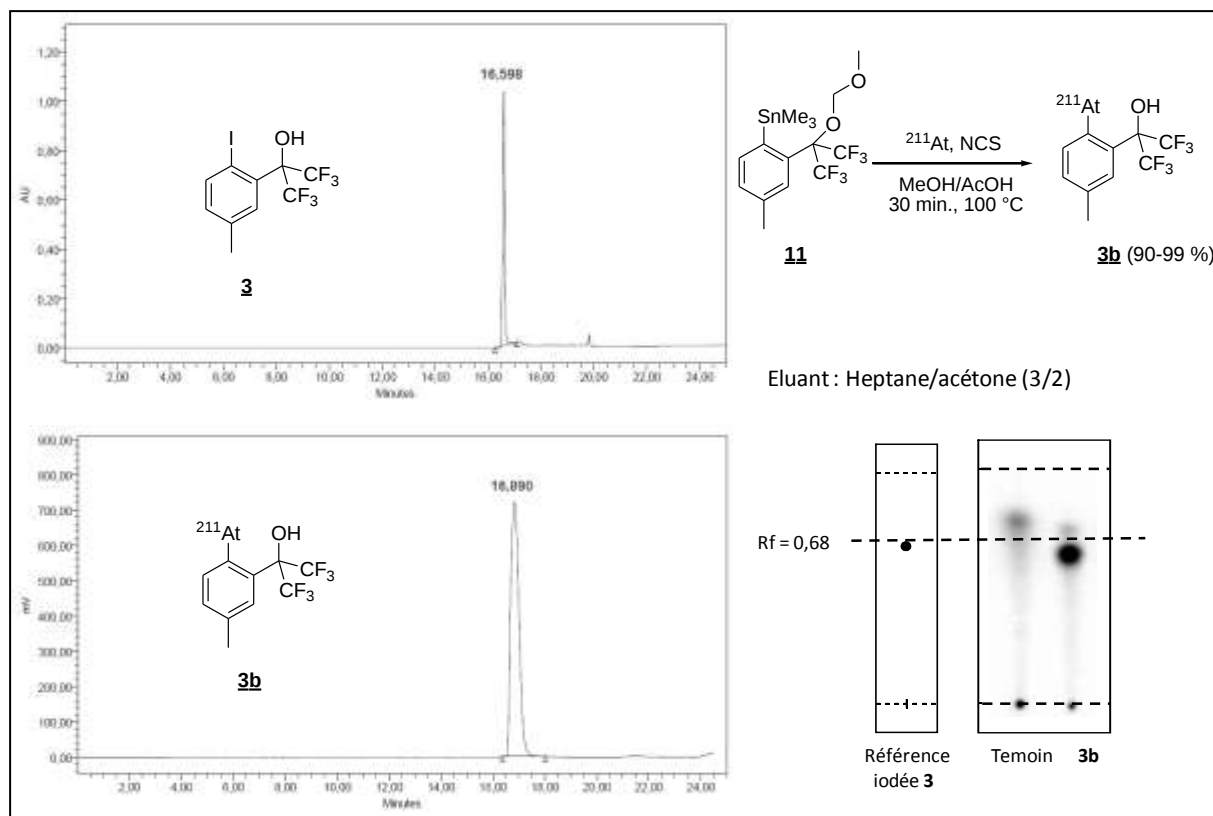


Figure 52 : Analyses chromatographiques de l'étape d'astatodéstannylation dans le méthanol.

Mise au point dans l'acétonitrile :

Seulement trois cibles d'astate-211 ont pu être distillées et récupérées en acétonitrile, les données présentées dans ce solvant sont donc des résultats préliminaires qui permettent de mettre en évidence la faisabilité du radiomarquage mais qu'il conviendra de confirmer par la suite.

Ainsi les conditions de radiomarquage utilisées en méthanol/acide acétique ont été appliquées (quantités de précurseur et d'oxydant, durée et température de réaction). Le marquage a également été conduit sans acide acétique afin d'observer la formation du produit radiomarqué toujours protégé. Les résultats ont été surprenants avec l'obtention du produit déprotégé dans les deux cas. De plus, le rendement de radiomarquage est assez faible et meilleur en l'absence d'acide acétique (10 % contre 18 %), le reste de l'activité correspondant à nouveau majoritairement à un ou des produits volatils non visible sur les CCM (Figure 53).

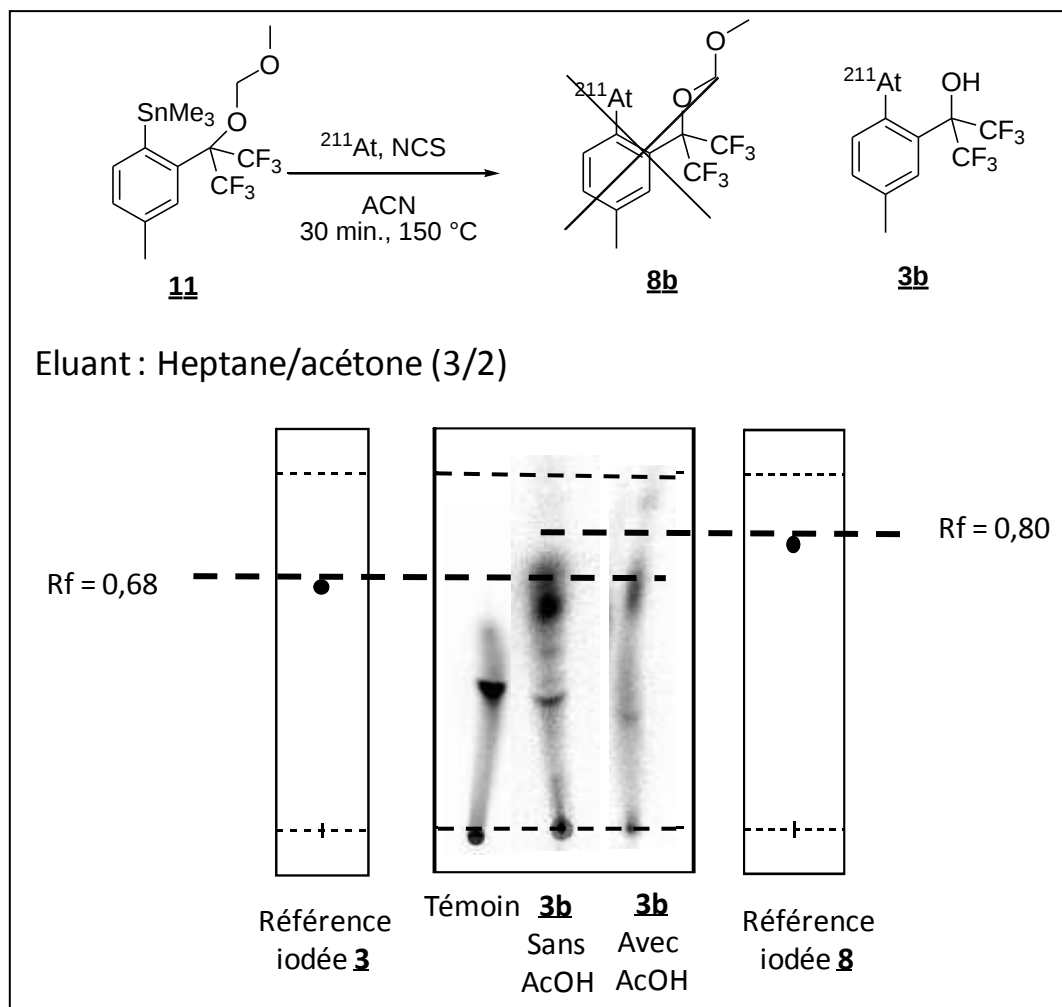


Figure 53 : Analyses chromatographiques de l'étape d'astatodestannylation en acétonitrile.

Une augmentation des quantités de précurseur et d'oxydant (multipliés par 10) ainsi qu'une optimisation de la température et de la durée de réaction permet toutefois de retrouver des rendements de marquage similaires à ceux obtenus dans le méthanol. Ainsi en 45 minutes à 150 °C, un rendement maximum de 98 % est atteint (Figure 54).

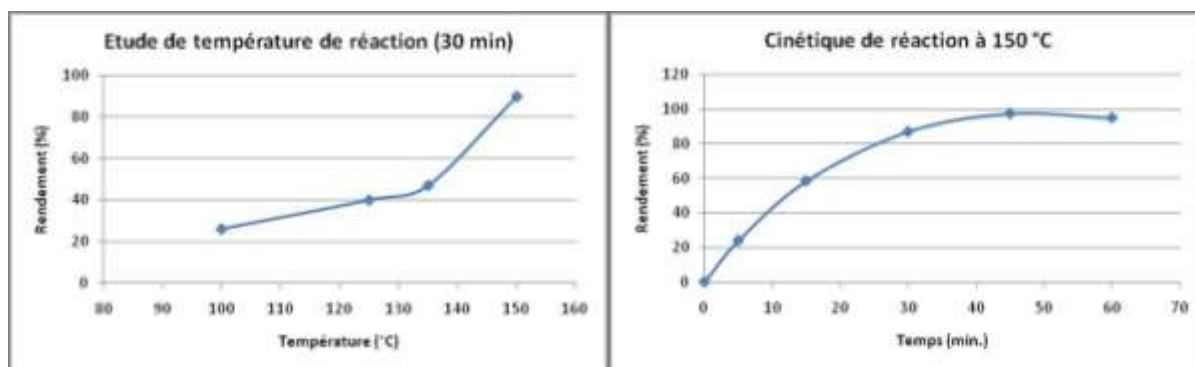


Figure 54 : optimisation de la température et du temps de réaction.

I-4-2-3. Formation des espèces hypervalentes

Pour la formation du bromoastatane **12e**, les conditions utilisées pour l'obtention de l'analogue iodé **12c** ont été reprises. Ainsi, l'ajout de NBS en solution dans le chloroforme et d'acide chlorhydrique à la solution de marquage permet d'observer après 30 minutes à 60 °C la formation du composé hypervalent attendu. Toutefois, le taux de conversion est très peu reproductible. L'utilisation de NBS en solution dans l'isopropanol améliore cette reproductibilité avec des taux de conversion allant jusqu'à plus de 95 % (Figure 55). Quelques essais ont également été effectués à partir de solutions de marquage en acétonitrile avec des résultats similaires. Le retour à l'état monovalent a été testé par ajout d'une solution de sulfite de sodium au milieu. On observe dans ce cas le retour à la forme **3b**, mais celui-ci est incomplet après 30 minutes (environ 20 % de conversion) alors qu'il est instantané avec les analogues iodés. Ce résultat permet d'envisager une forme hypervalente de l'astate plus stable que l'équivalent iodé puisque plus difficile à réduire. D'autres conditions de réduction restent à étudier pour confirmer la stabilité de cette forme de l'astate.

Des essais de formation du chloroastatane **12f** ont été effectués, notamment en présence d'hypochlorite de sodium en milieu acide mais la formation du composé attendu n'a pas été observée, même par chauffage à 60 °C. L'optimisation des conditions n'a cependant pas été effectuée, ces résultats reposants sur quelques essais seulement. Ils montrent toutefois la nécessité de conditions probablement plus dures qu'avec l'iode pour former l'espèce hypervalente porteuse d'un chlore.

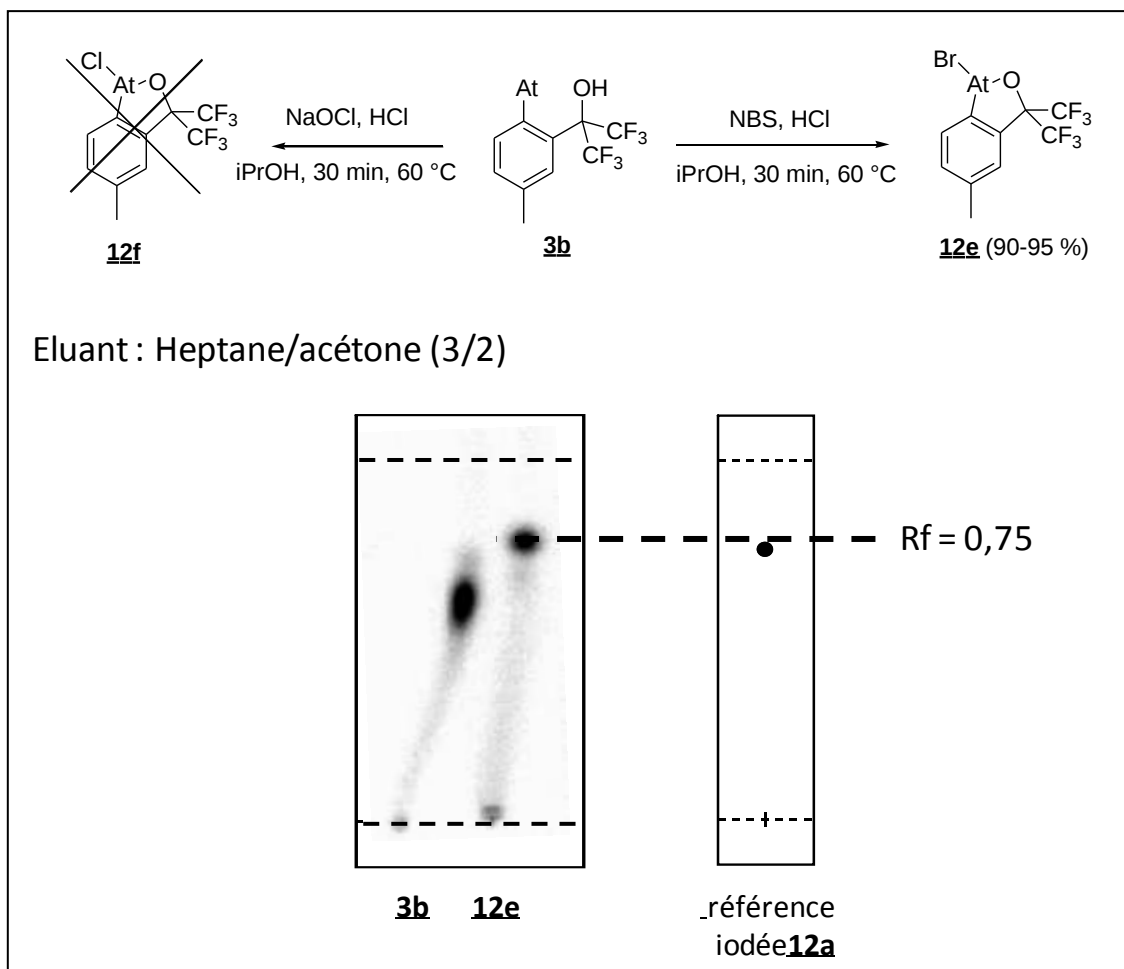


Figure 55 : Formation des composés hypervalents **12e** et **12f**.

I-5. Conclusion sur la formation des espèces hypervalentes astatées

Cette première partie du projet de recherche a permis de mettre en évidence pour la première fois la possibilité de former des espèces trivalentes organiques de l'astate. Elle a nécessité la préparation d'un précurseur stannique adapté. La méthode d'extraction par voie humide en place dans notre laboratoire n'a pas permis d'obtenir les composés radiomarqué à l'astate-211 souhaités, probablement à cause de la trop haute concentration d'acide nitrique dans le milieu conduisant à la dégradation du précurseur et des produits formés. Toutefois, la mise en place d'une méthode d'extraction par voie sèche a permis de s'affranchir de certains problèmes causés par la voie humide. Seule la forme d'astate hypervalent liée à un brome a été obtenue, les conditions permettant l'accès à l'équivalent chloré restant encore à explorer. Les conditions de radiomarquage n'ont pas encore fait

l'étude d'une optimisation poussée en raison du nombre limité de cibles d'astate-211 reçues durant ces travaux et de nombreux paramètres restent donc à étudier. La résolution de la nature de la ou des formes volatiles formées lors de ces radiomarquages reste également à réaliser afin de comprendre l'origine de ce phénomène qui perturbe les radiomarquages.

La faisabilité du radiomarquage des anticorps avec de l'astate-211 sous forme de bromoastatane est abordée dans la seconde partie des résultats. La conception des précurseurs bifonctionnels et leur radiomarquage à l'iode-125 et à l'astate-211 sont présentés ainsi que le couplage à une protéine et les premiers résultats de stabilité *in vitro*.

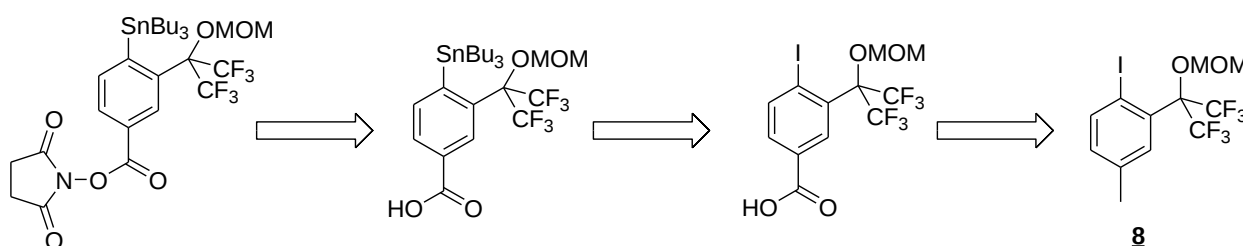
II. Développement et radiomarquage des précurseurs bifonctionnalisés

II-1. Méthode générale d'accès aux précurseurs

La méthode la plus courante de radiomarquage indirect des anticorps avec les halogènes est la formation d'une liaison amide entre les amines des chaînes latérales des lysines de l'anticorps et un ester activé du synthon radiomarké (méthode de marquage avec le SAB décrite en page 48). Cette méthode présente l'avantage d'être utilisable sur de nombreux anticorps porteurs de sites réactifs vis-à-vis des esters activés. Toutefois les conditions de couplage ne permettent pas l'obtention de rendements quantitatifs. Le pH requis (généralement d'environ 8,5) pour obtenir des amines suffisamment réactives sur l'anticorps correspond également à un pH conduisant à l'hydrolyse de l'ester activé. Le couplage et l'hydrolyse sont donc deux phénomènes en concurrence permettant des rendements de couplage d'environ 60 % dans les meilleurs des cas.

Il a dans un premier temps été envisagé d'utiliser la position benzylique libre de nos précurseurs pour y générer un ester activé de type N-hydroxysuccinimide. Pour cela, l'oxydation du méthyle benzylique en acide carboxylique sur le composé **8** suivie de l'introduction du groupement stannique puis de l'activation sous forme d'ester de N-hydroxysuccinimidyle constituent la séquence qui a été envisagée :

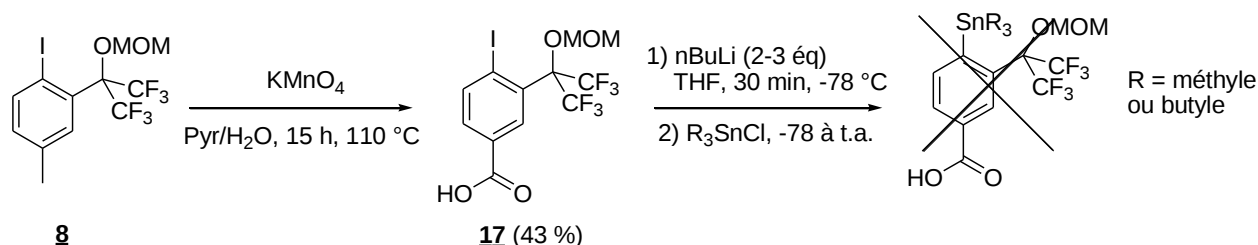
Schéma 12 :



De nombreuses méthodes d'oxydation de la position benzylique sont décrites en conditions acides, mais celles-ci ne permettraient pas la préservation du groupement protecteur MOM (HNO_3 ou CrO_3/HOAc ou encore $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7/\text{H}_2\text{SO}_4$). L'utilisation de permanganate de potassium en milieu basique (pyridine/eau) a été choisie et a permis l'obtention du dérivé acide carboxylique **17**. Toutefois, les méthodes d'introduction du groupement stannique employées, similaires à celles ayant fonctionné avec succès pour

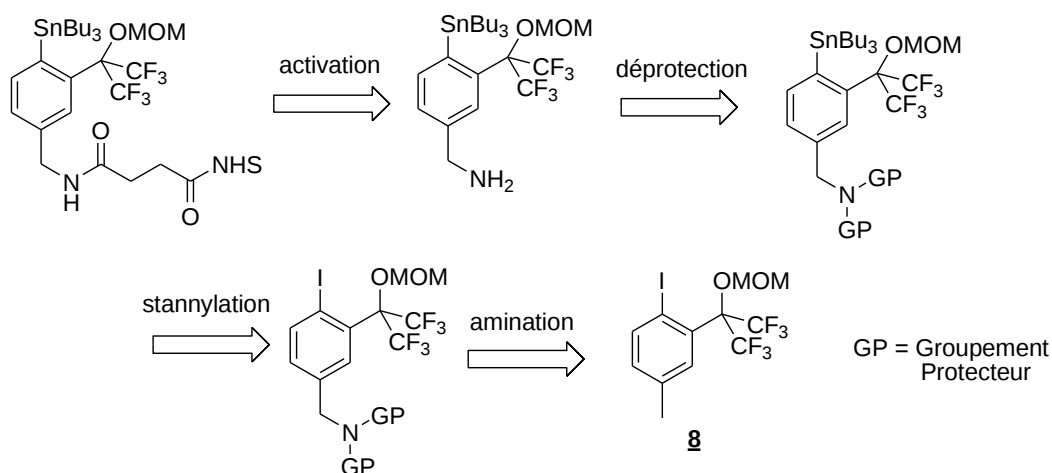
l'obtention du précurseur non fonctionnalisé **11** n'ont pas donné le résultat escompté. Les analyses par CCM et spectrométrie de masse montrent la formation d'un mélange complexe comprenant le composé souhaité qu'il n'a pas été possible d'isoler.

Schéma 13 :



Une autre méthode d'introduction de la fonction de couplage a donc été envisagée, en générant dans un premier temps une amine protégée sur la position benzylique suivie de l'introduction du groupement stannique, la déprotection de l'amine suivie de l'activation sous forme d'ester de N-hydroxysuccinimidyle permettant d'obtenir un précurseur bifonctionnel proche de celui souhaité à l'origine.

Schéma 14 :



Le choix du groupement protecteur de l'amine a été guidé par la nécessité de préserver le groupement stannique, sensible à de nombreux agents, et le MOM lors de l'étape de déprotection. Il doit également résister aux conditions de stannylation (nBuLi). Le groupement protecteur le mieux adapté a semblé être le groupement allyle, pour lequel une procédure de déprotection douce a été décrite par F. Garro-Helion *et al*¹³⁹. Cette méthode de déprotection est basée sur la réaction de transfert d'allyle de Tsuji-Trost. Celle-ci consiste en l'allylation catalysée au palladium de nucléophiles tels que les méthylènes activés, les énolates, les amines ou les thiols avec un composé allylé de type acétate d'allyle ou bromure d'allyle¹⁴⁰ (Figure 56).

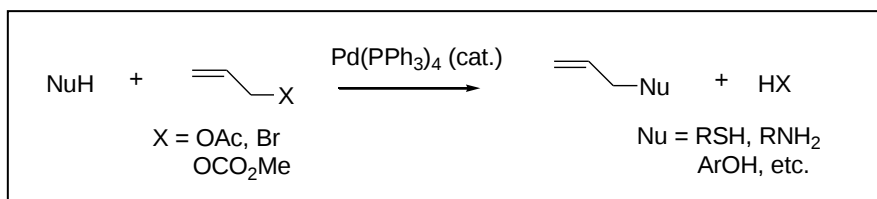


Figure 56 : principe de la réaction de Tsuji-Trost.

Cette réaction a été adaptée par F. Garro-Helion pour la déprotection des allylamine, le groupement X correspondant alors à une amine et le nucléophile jouant ici le rôle de piège à allyle. En présence catalytique de Tétrakis(triphénylphosphine)palladium(0), l'amine déprotégée peut être obtenue en 2 heures à 30 °C dans le dichlorométhane, l'acide N,N-diméthylbarbiturique (NDBA) servant de nucléophile piègeur d'allyle. Le mécanisme proposé par les auteurs est décrit dans la Figure 57.

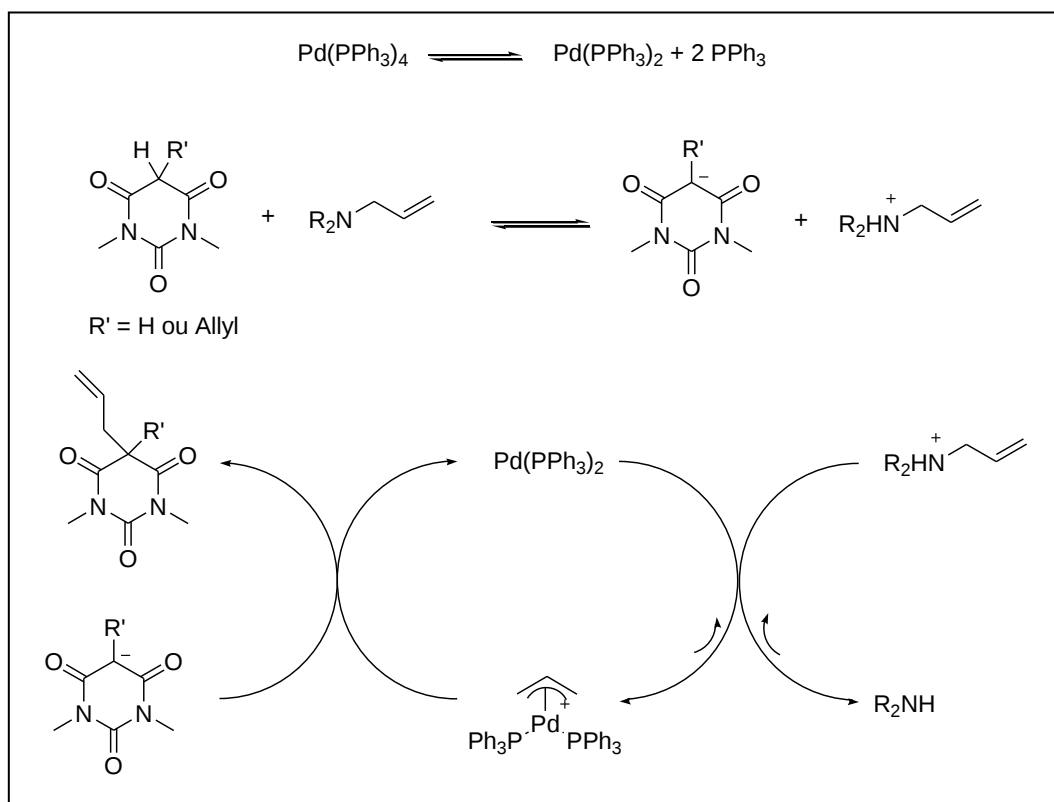
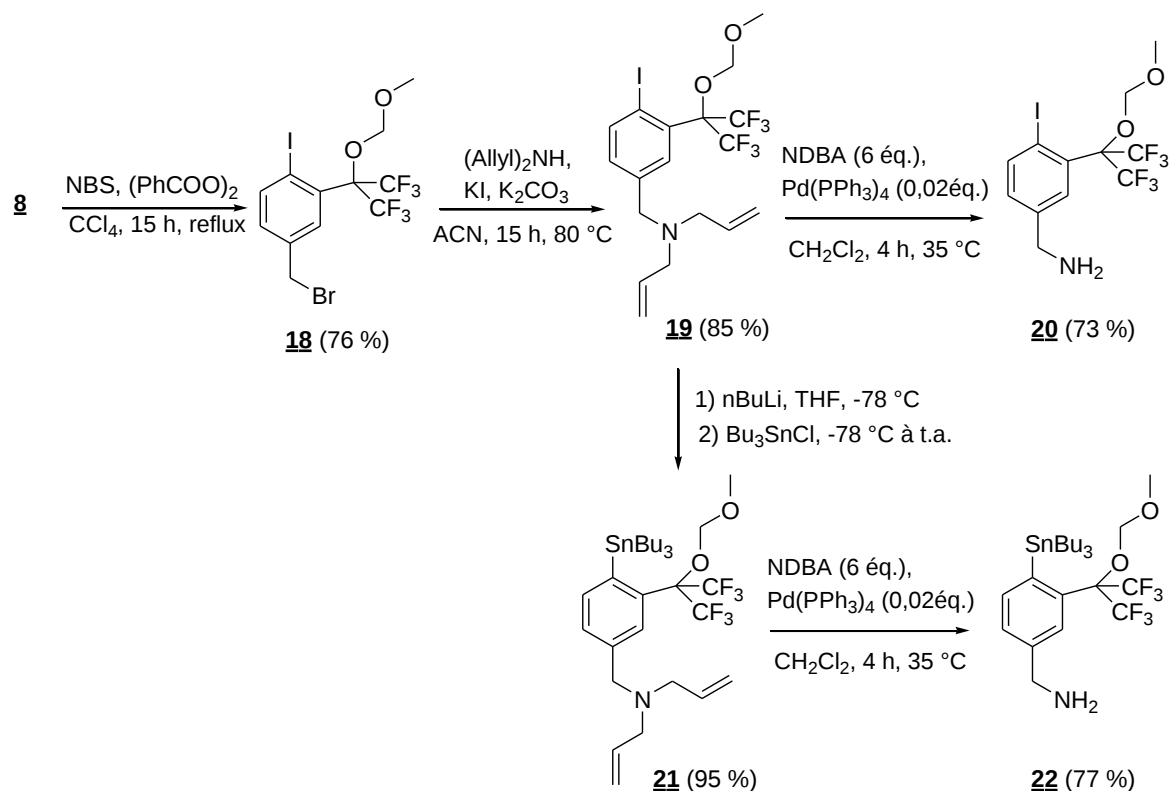


Figure 57 : Mécanisme de déprotection des allylamine. L'équilibre prototropique entre l'allylamine et le NDBA permet de générer l'ammonium et le carbanion impliqués dans le cycle catalytique. La formation d'un complexe entre le palladium et l'allyle permet de libérer l'amine alors que l'allyle est capturé de façon irréversible par le NDBA ou le NDBA monoallylé formé lors des cycles précédents.

Cette méthodologie a été appliquée à partir du composé **8**, dont la position benzylique a été bromée en utilisant des conditions radicalaires standards (N-bromosuccinimide / initiateur de radicaux dans le tétrachlorure de carbone). La substitution nucléophile du brome par la diallylamine permet ensuite l'introduction du groupement aminé

protégé. La déprotection a dans un premier temps été testée sur le dérivé iodé dans les conditions décrites par F. Garro-Helion. Le composé déprotégé **20** a ainsi été obtenu après isolation avec un rendement de 73 %. L'introduction du groupement stannique dans les conditions employées précédemment (via le lithien) est réalisée avec succès, tout comme la déprotection qui permet d'obtenir le composé stannylé disposant d'une amine réactive pour la fonctionnalisation.

Schéma 15 :



A partir du composé **22** et d'autres analogues présentés ci-après, l'accès à des précurseurs bifonctionnalisés activés sous forme d'esters de N-hydroxysuccinimidyle ou sous forme de maléimides a été rendue possible. Le couplage direct à la biotine a également été étudié. Les différentes stratégies de synthèse et les résultats des radiomarquages sont présentés dans chacun des paragraphes suivants.

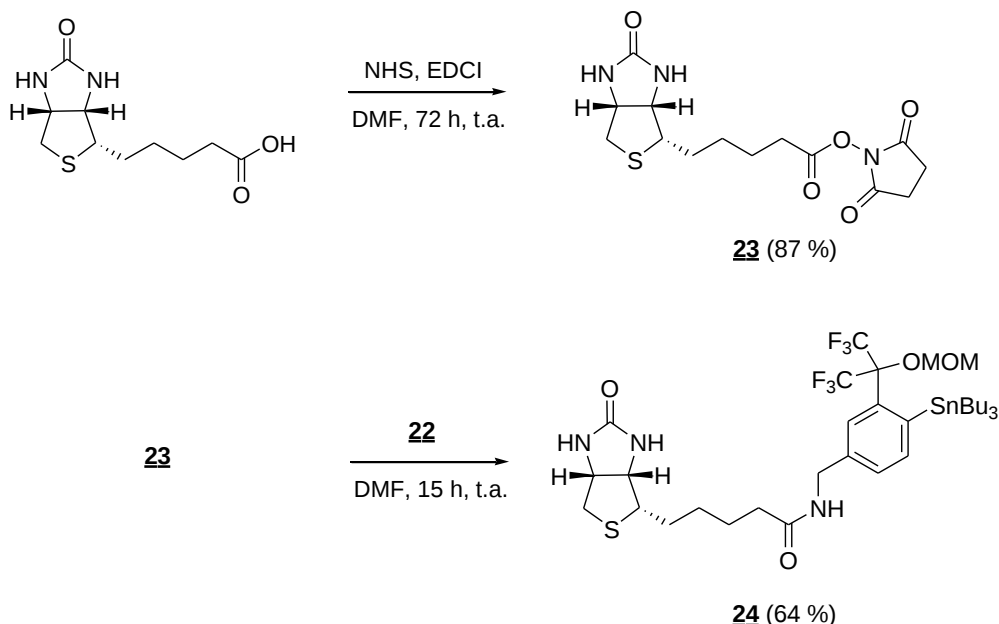
II-2. Couplage à la biotine

La biotine a semblé dans un premier temps intéressante comme vecteur, celle-ci permettant de tester la méthode de radiomarquage sur un modèle plus simple qu'un anticorps. Sa très forte affinité pour l'avidine et la streptavidine en font également un outil très puissant pour les tests *in vivo* et *in vitro*. Le composé stannique **22** a donc été couplé à la biotine pour former un nouveau précurseur. Le radiomarquage direct de la biotine ainsi modifiée a ensuite été étudié.

II-2-1. Synthèse de la biotine stannylée

La biotine possède dans sa structure une fonction acide carboxylique permettant de la coupler facilement à des amines après activation. L'ester de N-succinimidyle **23** a donc été formé par une méthode conventionnelle employant une activation du carbonyle par un carbodiimide (l'EDCI) permettant l'introduction de la N-hydroxysuccinimide. Le couplage est ensuite effectué avec le composé **22** pour former le dérivé de biotine **24**, pouvant être radiomarké.

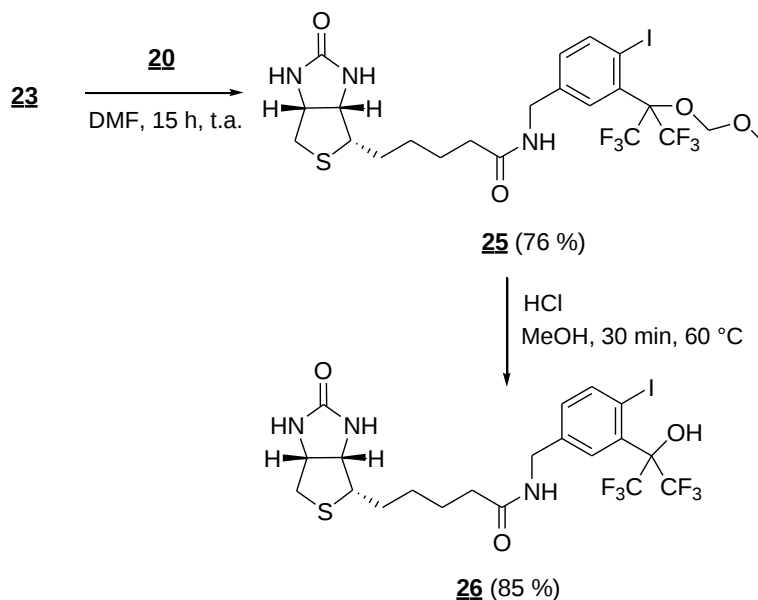
Schéma 16 :



II-2-2. Préparation des références analytiques iodées

Les analogues iodés froids des différentes étapes du radiomarquage ont été préparés pour références analytiques à partir du composé **20**.

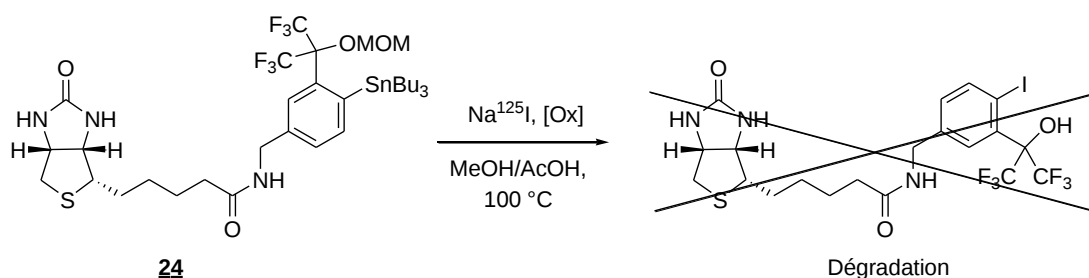
Schéma 17 :



II-2-3. Radiomarquage

L'introduction de l'iode-125 sur la biotine stannylée **23** a été testée dans les conditions optimisées pour le précurseur non fonctionnalisé **11**. Toutefois, les analyses par CCM montrent la formation d'un mélange complexe issu de la probable dégradation du dérivé de biotine dans les conditions plutôt dures nécessaires (100 °C, présence de N-chlorosuccinimide et d'acide acétique dans le méthanol). Des températures plus basses ne permettent pas à la substitution électrophile de s'effectuer et l'utilisation d'autres oxydants (acide peracétique, peroxyde d'hydrogène ou iodogen®) conduisent également à une dégradation importante.

Schéma 18 :



L'absence du produit radiomarqué a pu être confirmée par incubation du milieu réactionnel dans des tubes sur lesquels est adsorbé de l'avidine. Un comptage de l'activité fixée sur l'avidine après vidage et lavage des tubes montre une fixation d'environ 2 à 3 % de l'activité totale.

Ces résultats décevants dus aux conditions trop dures nécessaires à l'introduction de l'iode nous ont conduits à écarter cette voie de radiomarquage sur la biotine. D'autres méthodes sont envisageables, notamment par radiomarquage indirect consistant à introduire le radionucléide sur précurseur stannique avant couplage à la biotine, mais elles n'ont pas été abordées lors de ces travaux de thèse.

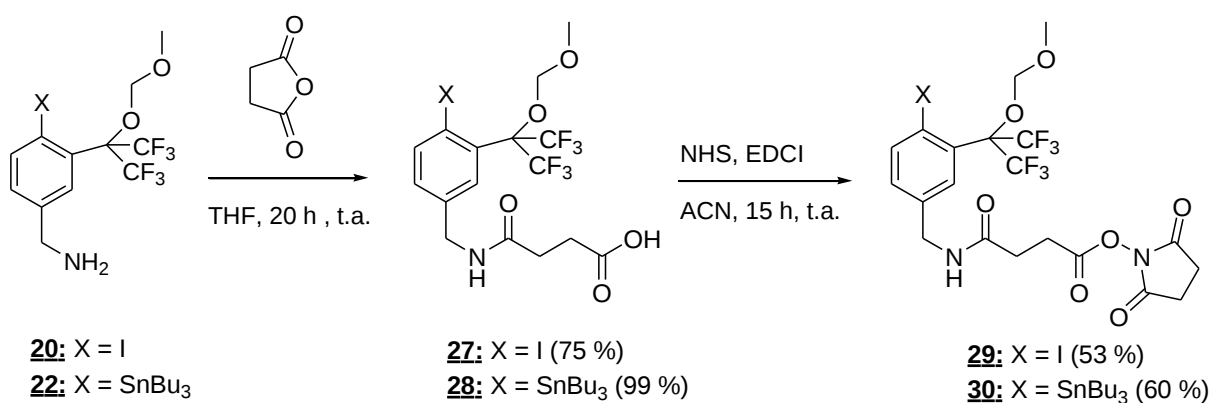
Les composés présentés ci-après ont été conçus avec pour objectif le radiomarquage des structures protéiques telles que les anticorps.

II-3. Précurseur activé en NHS

II-3-1. Synthèse du précurseur

La possibilité de radiomarquer des structures protéiques avec notre nouvelle méthode de radiomarquage a été envisagée à partir d'un nouveau précurseur obtenu en deux étapes à partir du composé **22**. La séquence consiste en la génération d'un acide carboxylique par couplage de l'amine sur l'anhydride succinique suivi de la génération de l'ester activé pour former le nouveau précurseur bifonctionnel **30**. Les équivalents iodés sont obtenus par la même méthode à partir du composé **20**.

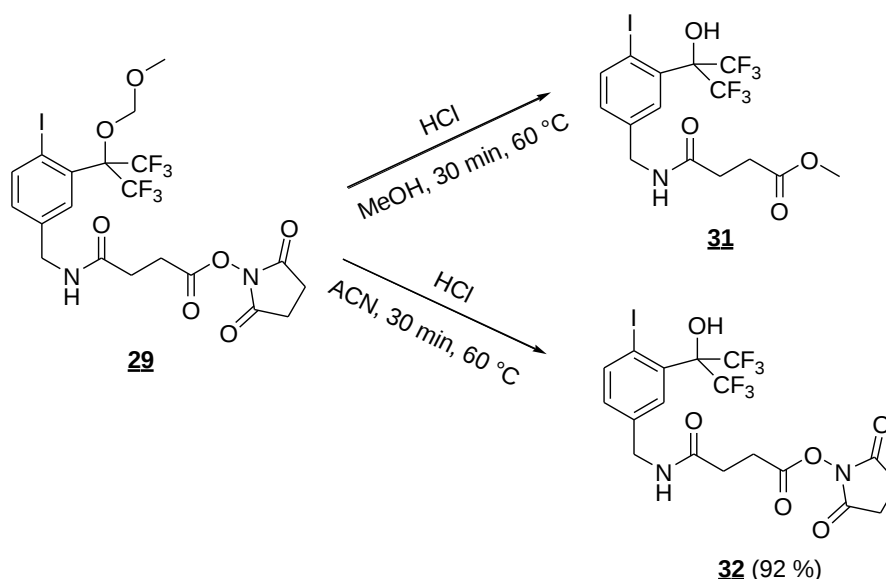
Schéma 19 :



II-3-2. Préparation des références iodées

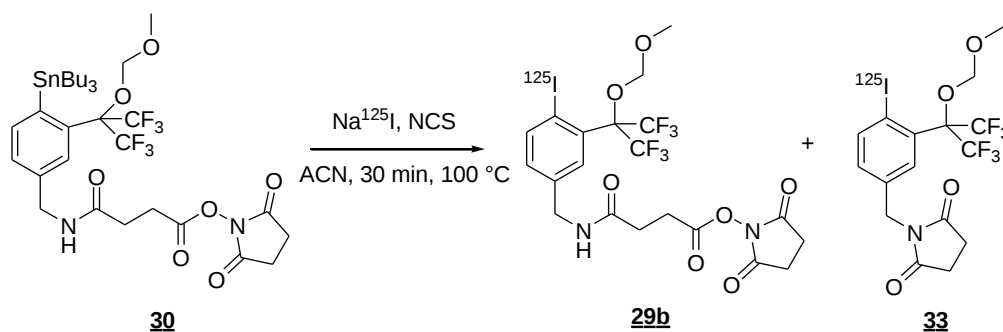
La référence analytique correspondant à l'étape d'iododéstannylation a été préparée à partir du composé protégé **29**. Cependant, les conditions établies précédemment pour déprotection du MOM (HCl dans le méthanol à 60 °C) conduisent également à la transestérification par le méthanol du NHS. Le remplacement du méthanol par de l'acétonitrile comme solvant de réaction permet toutefois l'obtention du composé souhaité **32**.

Schéma 20 :



II-3-3. Radiomarquages

Etant donné la transestérification observée dès 60 °C dans le méthanol en milieu acide, les conditions classiques de radiomarquage du composé **30** à l'iode-125 dans le méthanol à 100 °C en présence d'acide acétique n'ont pas été testées. Le marquage a donc été réalisé dans l'acétonitrile. Tout comme avec le précurseur non fonctionnalisé, le pourcentage d'introduction de l'iode-125 est assez faible (15 %), le reste de l'activité étant présent sous une forme volatile. Toutefois, la présence d'un produit secondaire minoritaire (selon un rapport 77/23) est également observée. Le rapport frontal sur CCM montre qu'il s'agit du produit issu de la cyclisation du composé **32** par substitution intramoléculaire de l'azote de l'amide sur l'ester activé (Schéma 21). Ce phénomène est confirmé par la cyclisation du composé **29** dans les mêmes conditions de solvant et de température observée par analyses en RMN et spectrométrie de masse.

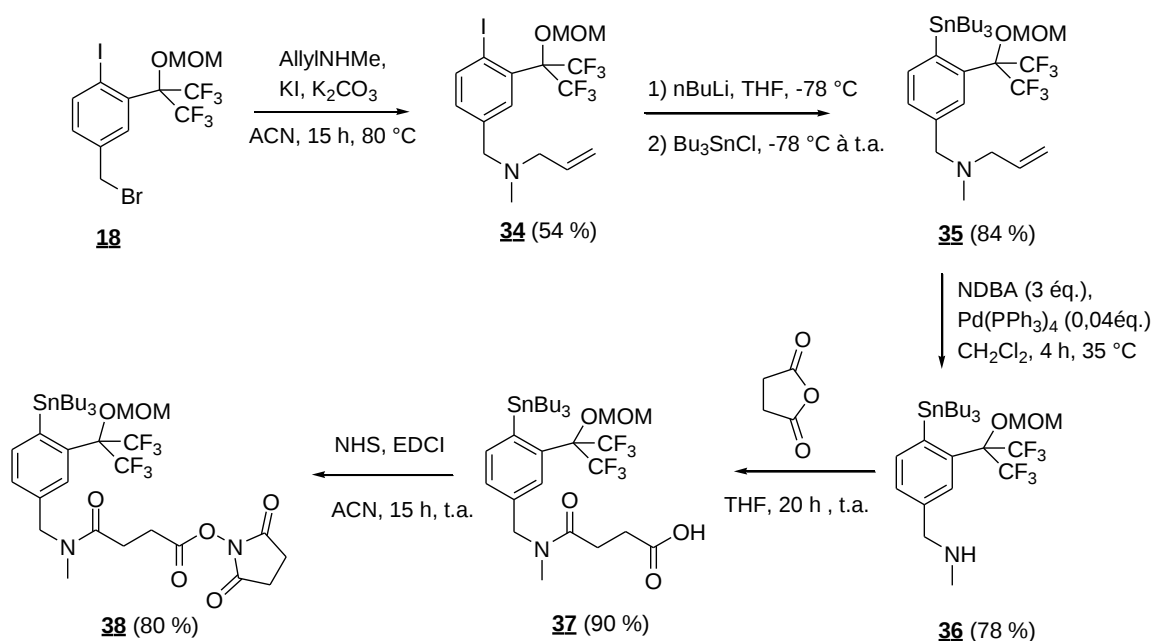
Schéma 21 :

La forme cyclisée **33** n'étant pas réactive vis-à-vis des anticorps, il a donc été nécessaire de préparer un nouveau précurseur afin de s'affranchir de ce phénomène de cyclisation. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser un amide substitué par un méthyle bloquant la possibilité de cyclisation.

II-4. N-méthylation du précurseur activé en NHS

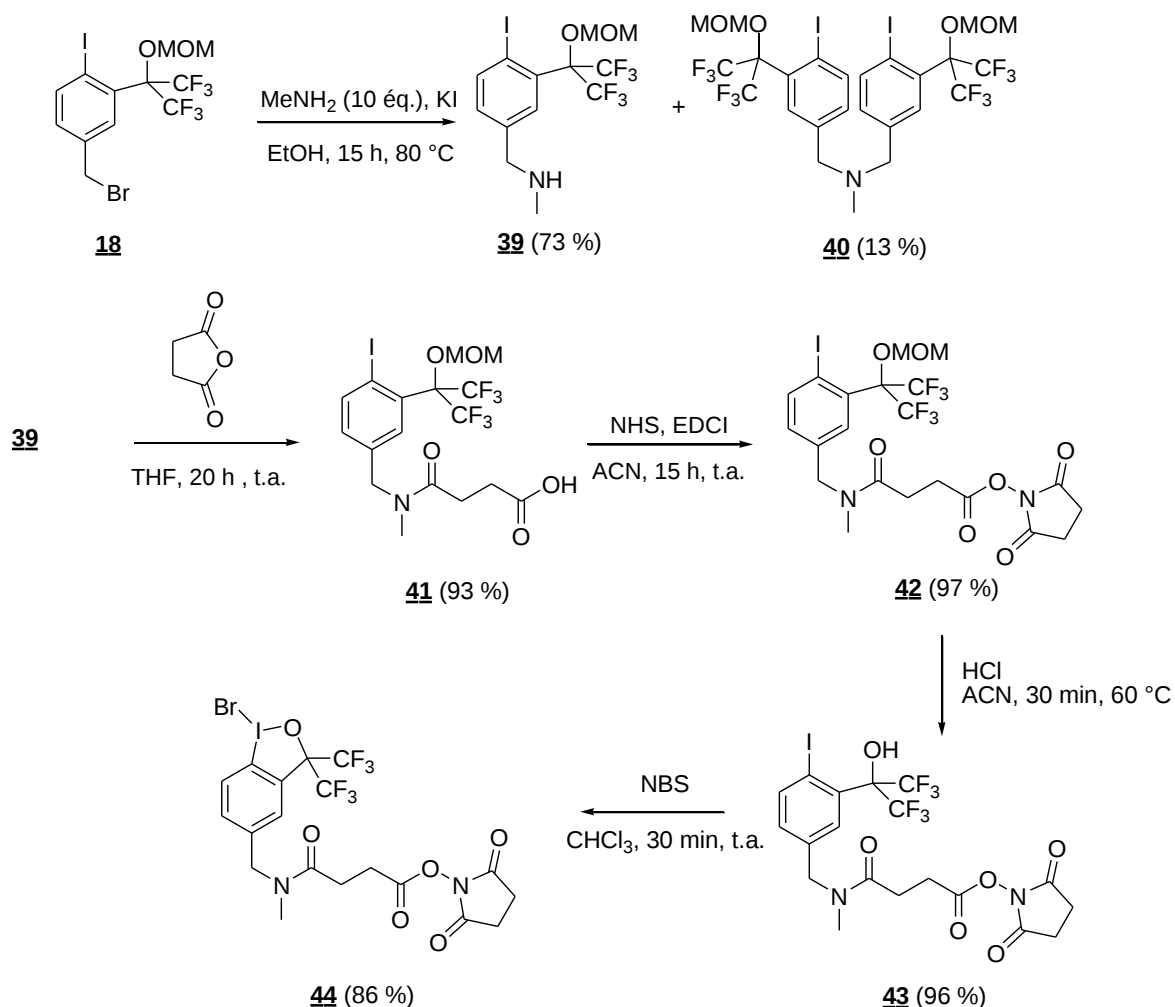
II-4-1. Synthèse des précurseurs et des références iodées

Le nouveau précurseur N-méthylé a pu être préparé selon une séquence de synthèse identique à la préparation du composé **30** à partir du dérivé iodé portant un brome en position benzylique **18**, la diallylamine étant simplement remplacée par la N-allylméthylamine lors de l'introduction de l'amine protégée.

Schéma 22 :

Les références iodées sont obtenues selon une séquence similaire à partir du composé bromé **18** (Schéma 23). L'amine méthylée pouvant être introduite sans groupement protecteur, la substitution a été réalisée directement avec la N-méthylamine, utilisée en large excès pour limiter la formation du composé dimérique **40**. La déprotection de l'hydroxyle est réalisée dans l'acétonitrile pour éviter la transestérification observée dans le méthanol puis le bromoiodane est formé dans les conditions mises au point précédemment.

Schéma 23 :



Le nouveau précurseur stannique **38** est destiné à être radiomarqué, couplé à un anticorps afin d'en évaluer la stabilité et de la comparer à la référence principalement utilisée aujourd'hui en recherche, le SAB. Toutefois les contraintes de synthèse décrites précédemment n'ont pas permis l'obtention d'un analogue structural du SAB en ce qui concerne la fonction de couplage. En comparaison avec le SAB, la fonction de couplage n'est plus connectée directement au noyau aromatique, mais fixée plus loin par l'intermédiaire d'un linker (Figure 58). Cette variation dans la structure du précurseur peut

conduire à elle seule à une modification de la biodistribution de l'anticorps et de sa stabilité *in vivo*, comme le démontre certains travaux ayant permis un gain de stabilité du SAB en déconnectant de façon similaire le carbonyle du SAB par l'intermédiaire d'un linker⁹⁹. Un analogue de notre nouveau précurseur **38** ne comportant pas le groupement hexafluoroisopropanol a donc également été préparé dans le but d'évaluer les modifications de comportement biologique induites par cette fonction de couplage seule. Elle nous permettra de distinguer l'origine de l'augmentation ou de la diminution de la stabilité des radiomarquages effectués à partir du composé **38**.

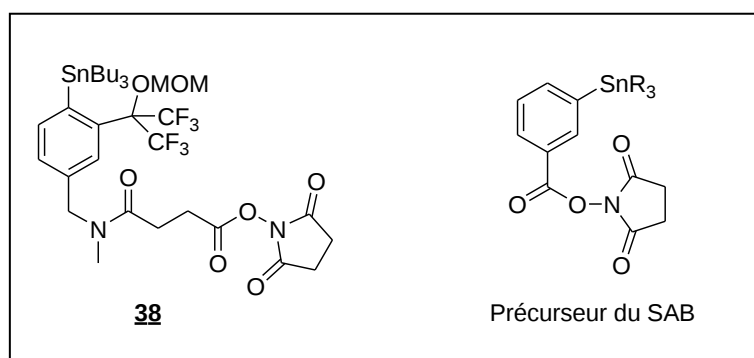
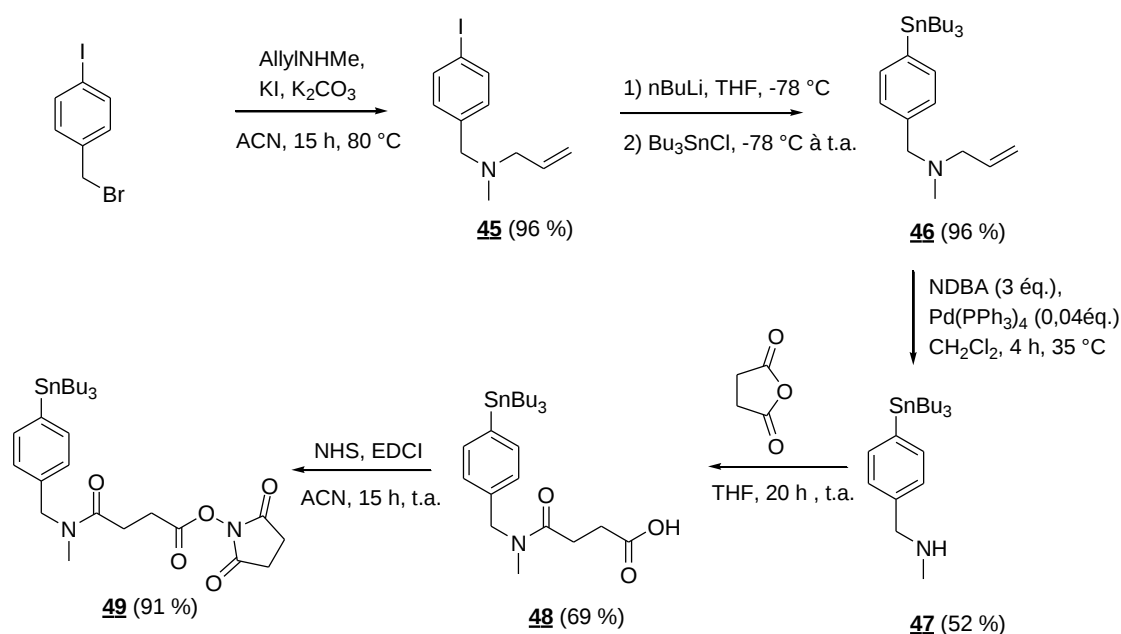


Figure 58 : Comparaison entre le précurseur **38** et le SAB. Un linker sépare le carbonyle activé du noyau aromatique dans le premier cas, influençant la densité électronique du noyau aromatique.

Ce nouveau précurseur est obtenu par une voie de synthèse identique à celle du composé **38** à partir du 1-(bromométhyl)-4-iodobenzène commercial.

Schéma 24 :

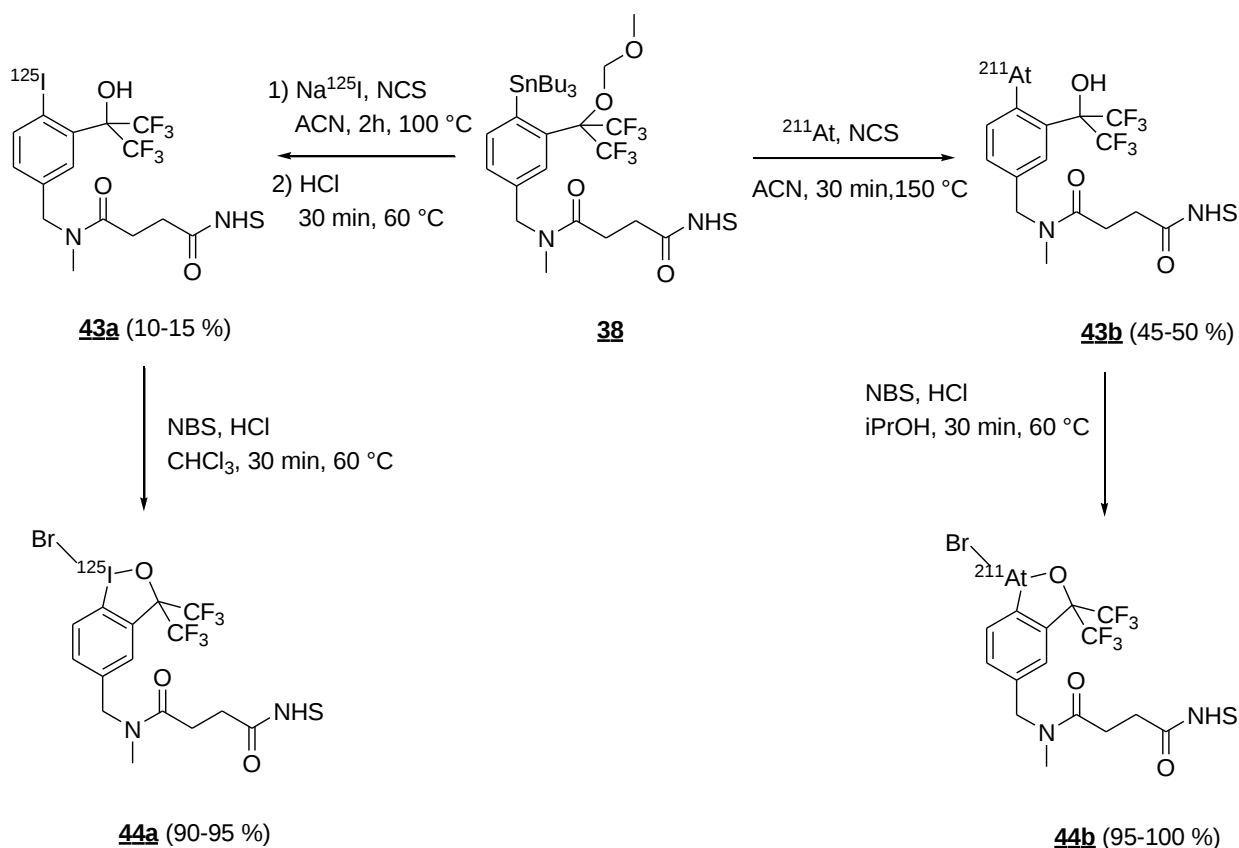


II-4-2. Radiomarquages

Radiomarquage du composé 38, précurseur de la forme hypervalente :

Les conditions de radiomarquage mises au point avec le précurseur non fonctionnalisé ont été utilisées telles quelles. En raison de la présence de l'ester activé, les radiomarquages ont été effectués dans l'acétonitrile. Les résultats sont similaires tant pour les radiomarquages à l'iode-125 qu'à l'astate-211. Ainsi, le produit iodé est obtenu sous forme protégée avec des rendements de l'ordre de 10-15 %, le reste de l'activité étant majoritairement une forme de l'iode volatile. La déprotection en milieu acide effectuée dans la deuxième étape est complète en 30 minutes. Le composé astaté est obtenu directement sous forme déprotégée **43b** avec des rendements de l'ordre de 50 %. Le taux de conversion en espèces hypervalentes **44a** et **44b** est de l'ordre de 90 à 100 %.

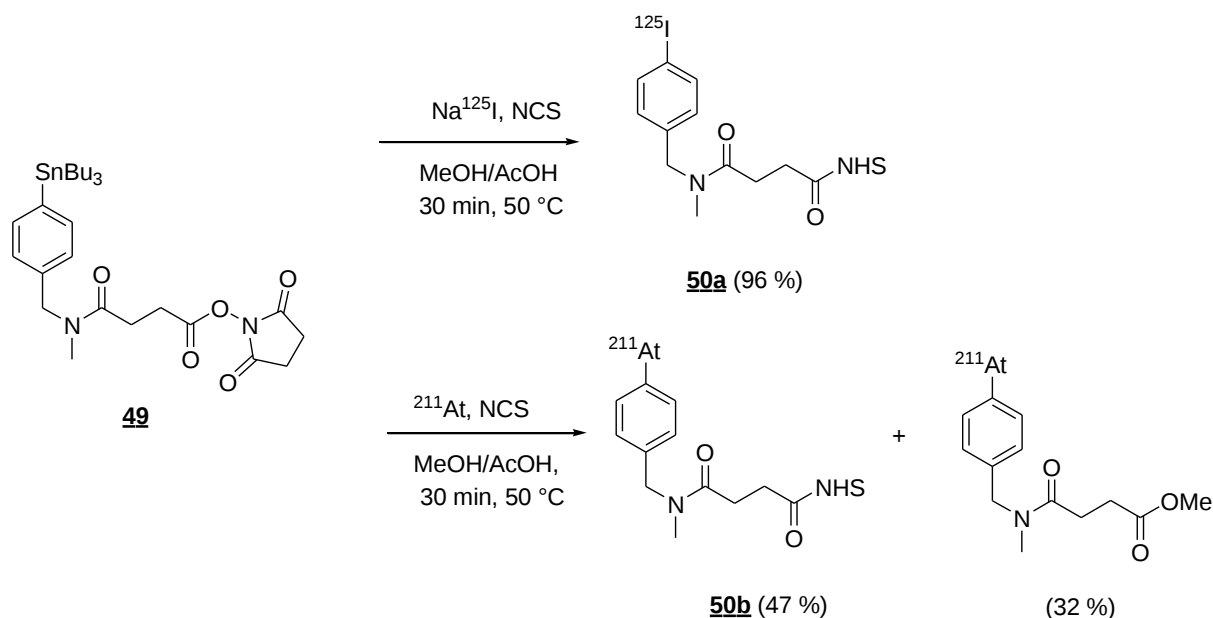
Schéma 25 :



Radiomarquage du composé 49, précurseur de la forme monovalente :

En raison de l'absence de groupement hexafluoroisopropanol encombrant, le radiomarquage de ce précurseur a pu être effectué dans des conditions similaires à la préparation de composés de type du SAB qui ne requièrent pas de températures élevées (20 à 50 °C). Ainsi, le marquage à l'iode-125 est quasiment quantitatif après 30 minutes à 40 °C. Pour le radiomarquage à l'astate-211 une température de 50 °C sur la même durée est nécessaire. On observe un rendement de substitution de 93 %, mais le produit est présent sous deux formes, celle attendue ainsi qu'une autre forme minoritaire correspondant probablement à la forme transestérifiée.

Schéma 26 :



Le radiomarquage à l'astate-211 reste à optimiser, l'utilisation d'acétonitrile comme solvant de réaction étant une solution pour s'affranchir de ce problème de transestérification.

En raison du faible nombre de distillations effectuées en acétonitrile, les travaux effectués sur les précurseurs activés sous forme d'esters de N-succinimides se sont limités à la démonstration de la faisabilité du radiomarquage qui reste à optimiser. Les conditions plus favorables en méthanol nous ont conduits à privilégier l'étude d'un précurseur activé sous forme de maléimide présenté ci-après.

II-5. Précurseurs activés sous forme de maléimide

La fonctionnalisation du précurseur stannique sous forme de maléimide donne accès à une méthode alternative de couplage aux anticorps. Avec ce type d'activation, le couplage ne s'effectue non plus sur les amines libres des anticorps, mais sur les thiols. Cependant, alors que les lysines, porteuses d'une amine sur leur chaîne latérale, sont généralement présentes en nombre suffisant sur les anticorps, la présence de thiols libres est beaucoup plus variable. Il existe toutefois des méthodes permettant de générer ces thiols, comme celle employant le 2-iminothiolane pour générer des thiols à partir des amines de l'anticorps (Figure 59). La réduction des $F(ab')_2$ permet également la génération de Fab' porteurs de thiols issus de la réduction des ponts disulfures (principe de la méthode décrit en page 13).

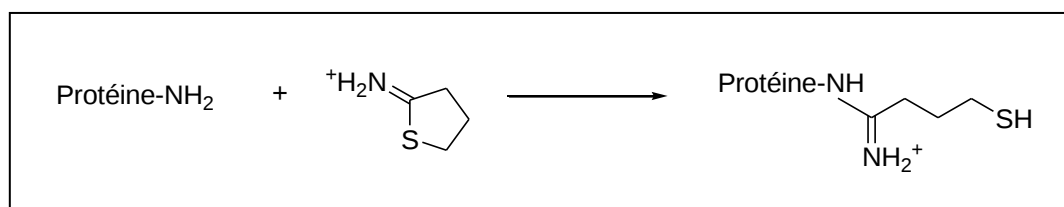
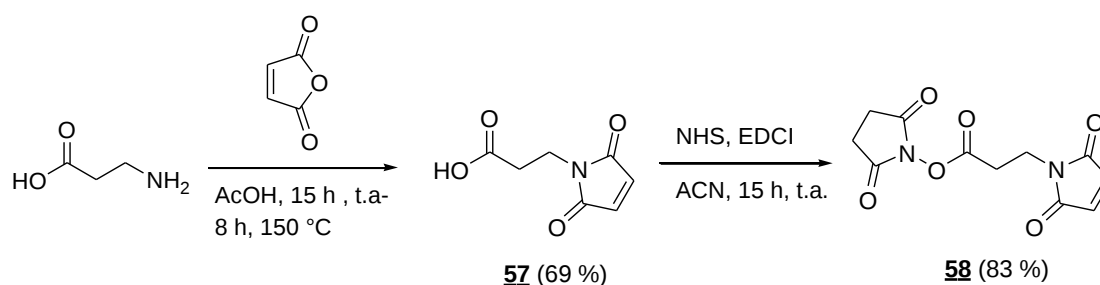


Figure 59 : Génération des thiols sur les protéines avec le 2-iminothiolane.

II-5-1. Synthèse des précurseurs stanniques

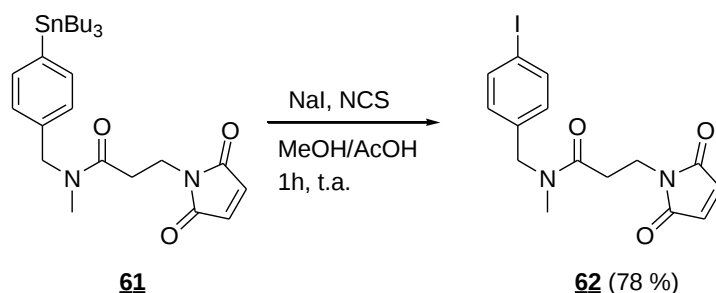
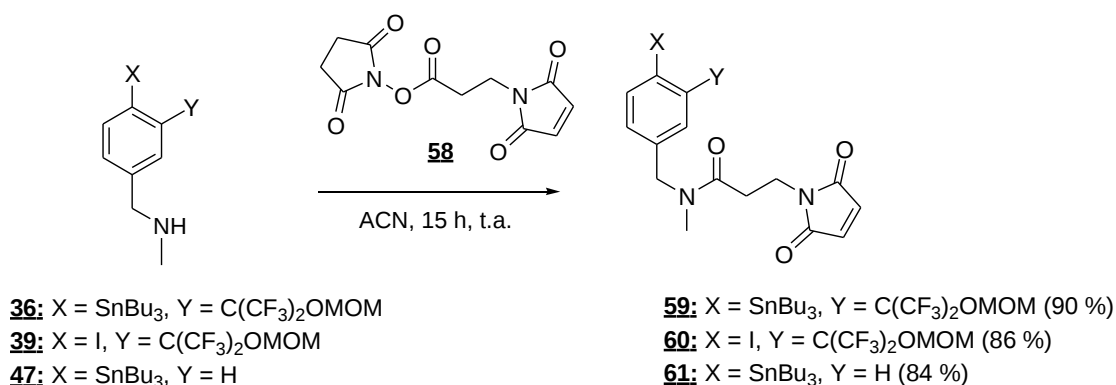
La synthèse du précurseur activé en maléimide a été réalisée à partir du composé méthylaminé **36**. Pour cela, un petit linker bifonctionnel porteur d'une fonction maléimide d'une part et d'une fonction ester de NHS d'autre part a été préparé à partir de la β -alanine en deux étapes. La première a consisté à former le maléimide sur l'amine de la β -alanine par couplage avec l'anhydride maléique suivi de la cyclisation dans l'acide acétique. L'acide carboxylique a ensuite été activé sous forme d'ester de NHS afin de permettre le couplage sur le précurseur stannique aminé.

Schéma 27 :



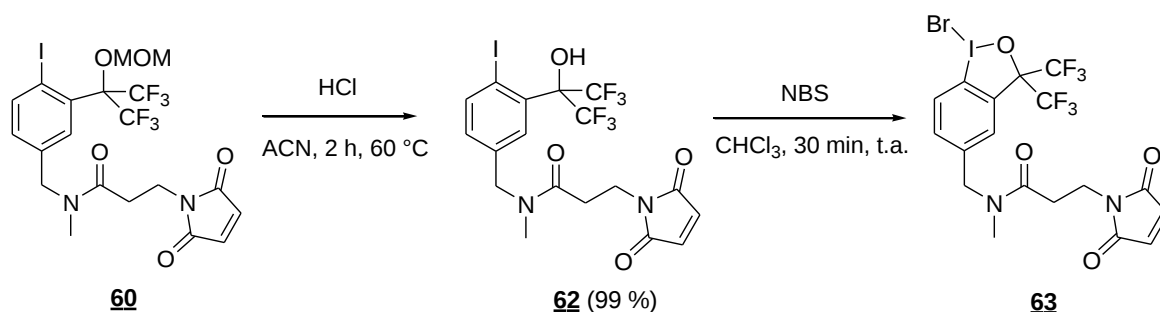
Le composé **58** a ensuite été couplé au précurseur **36** mais également au **47** afin de disposer d'un analogue ne portant pas de groupement hexafluoroisopropanol et d'évaluer l'influence du linker maléimide sur la stabilité du couplage par rapport au SAB. Les analogues iodés sont obtenus selon la même méthode, à l'exception du composé **62** formé directement à partir du composé **61** par iododestannylation.

Schéma 28 :



Les références iodées correspondant aux deux étapes de formation du bromoiodane ont également été préparées par la procédure habituelle en deux étapes à partir du composé **60** (déprotection puis oxydation par le NBS).

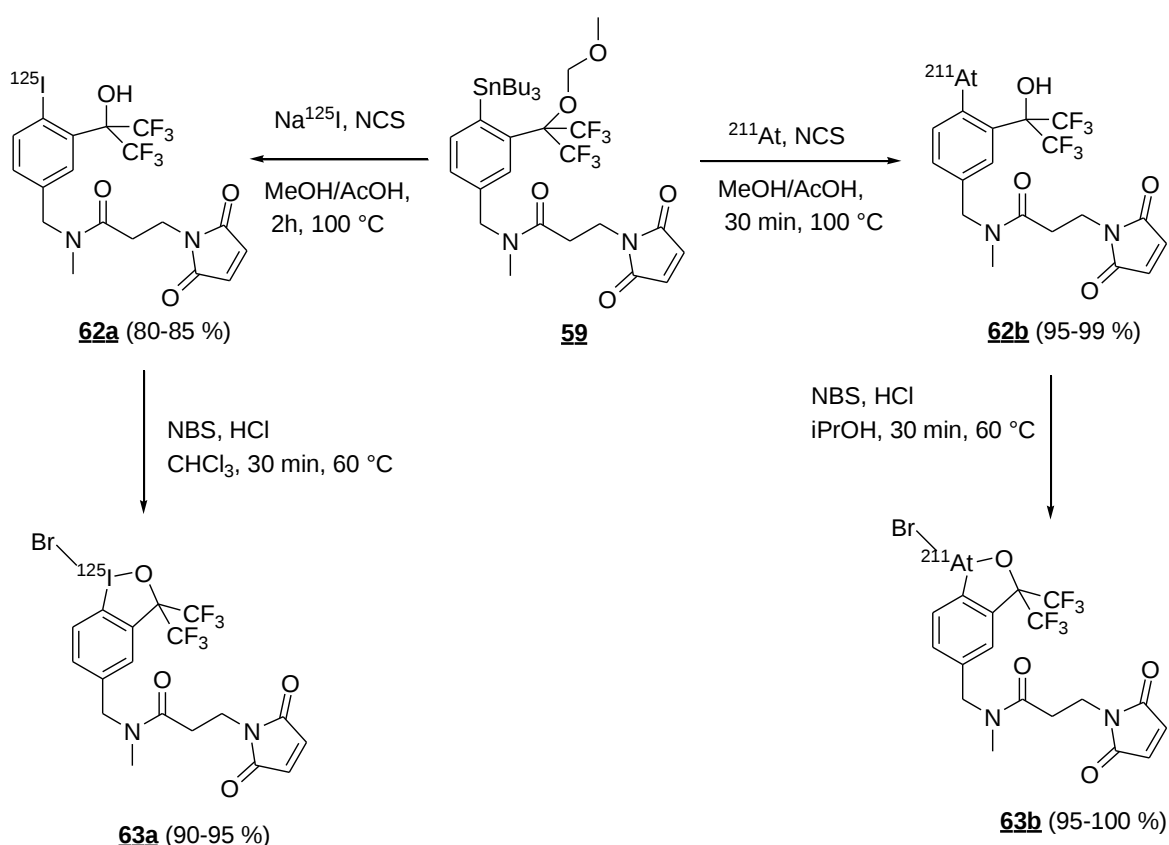
Schéma 29 :



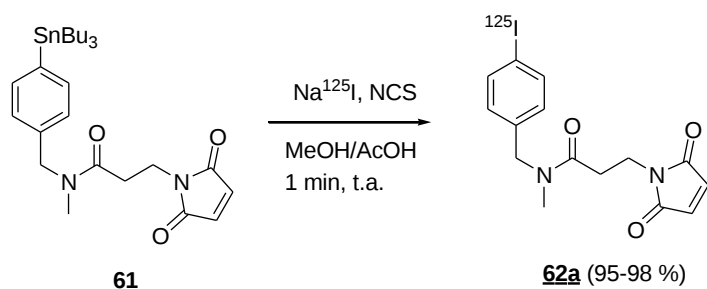
II-5-2. Radiomarquages

Les conditions établies pour le radiomarquage avec l'iode-125 et l'astate-211 du précurseur non fonctionnalisé pour le couplage ont été appliquées pour donner des résultats similaires avec de bons rendements tant pour l'étape d'halogénodestannylation (rendement supérieurs à 80 % et 90 % pour l'iode-125 et l'astate-211 respectivement) que pour la formation des espèces hypervalentes (90 à 100 % de conversion).

Schéma 30 :

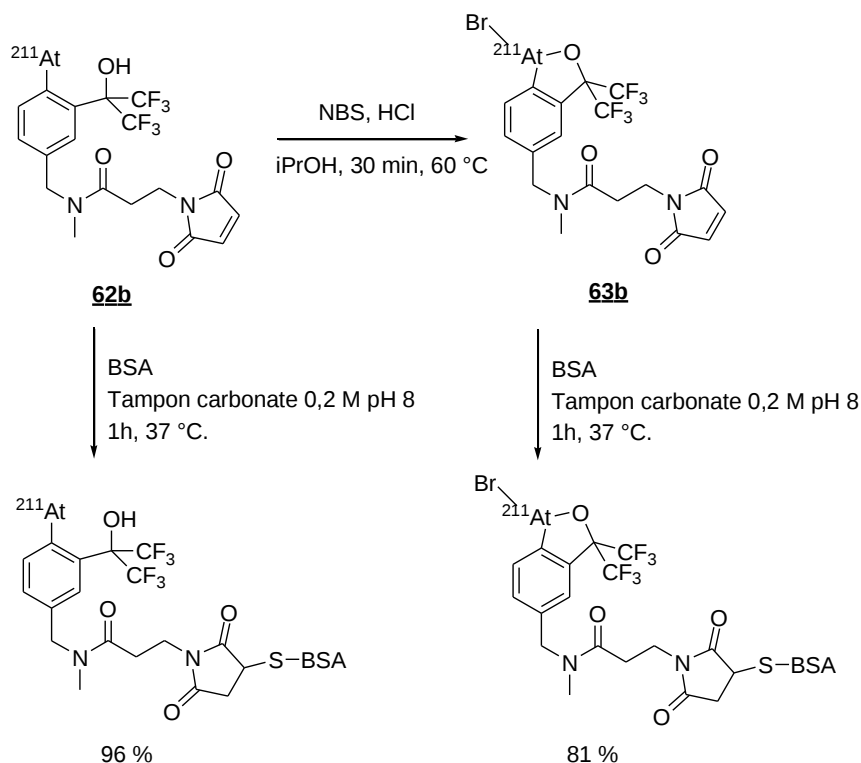


Le radiomarquage du précurseur **61** donnant accès au dérivé halogéné non porteur du groupement hexafluoré a été effectué avec l'iode-125. La substitution électrophile est quasiment instantanée, donnant accès au composé **62b** en 1 minute dans les conditions standards. Le radiomarquage à l'astate-211 n'a pas été testé pour le moment, mais l'étude de celui-ci sera nécessaire pour compléter les données de stabilité.

Schéma 31 :**II-5-3. Couplage à la BSA et stabilité *in vitro***

L'albumine de sérum bovin (BSA) a été envisagée comme premier modèle pour tester la faisabilité du couplage de nos composés à une structure protéique. C'est un modèle simple et peu coûteux. Il est de plus facile de générer de nombreux thiols sur la BSA (plus de 20 par molécule d'albumine) par réduction de ses ponts disulfures présents en grandes quantités.

Ainsi, les composés **62b** et **63b** ont été couplés à de la BSA préalablement réduite par le dithiothréitol avec de bons rendements 96 % et 81 % respectivement) après une heure d'incubation à 37 °C.

Schéma 32 :

Après purification par perméation sur gel, les composés couplés à la BSA ont été obtenus en solution dans le PBS (Tampon phosphate salin). Les stabilités sériques des marquages ont été évalués par incubation pendant 12 heures à 4 °C, 20 °C et 37 °C dans du sérum humain. L'élution des sérums sur colonne de perméation sur gel permet d'évaluer le pourcentage d'astate-211 toujours fixé à la BSA. Le comptage des fractions correspondant au volume de rétention de la BSA indiquent qu'à 4 °C et 20 °C, plus de 94 % de l'activité est toujours fixée à la protéine signifiant une très faible déshalogénéation. A 37 °C, les proportions d'astate-211 libéré sont un peu plus élevées avec 83 % et 86 % d'activité fixée sur la BSA pour les composés **62b** et **63b** respectivement (Figure 60). La déshalogénéation reste toutefois faible et les écarts entre le composé monovalent et l'hypervalent ne sont pas significatifs.

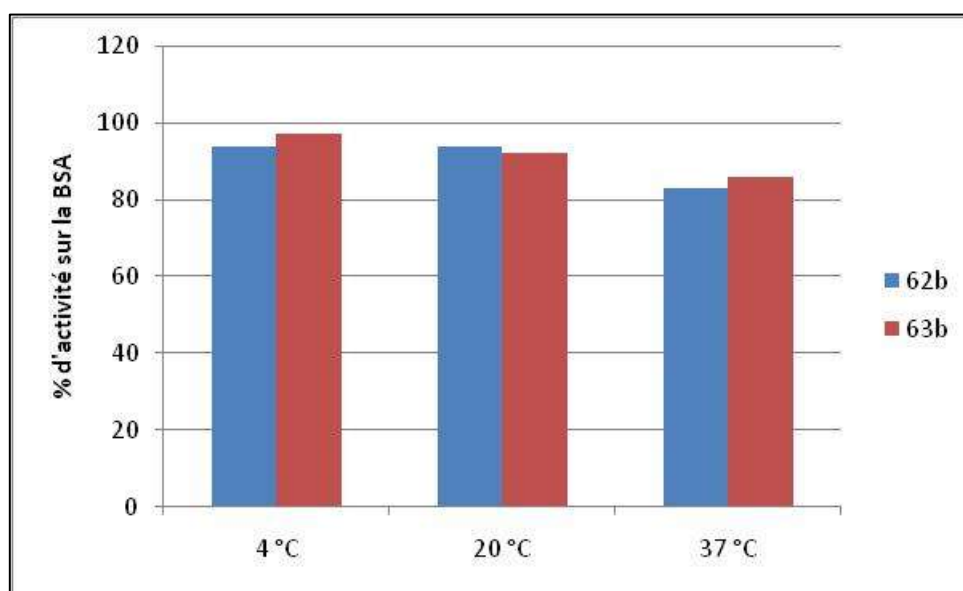


Figure 60 : Stabilité sérique des composés **62b et **63b** incubés 12 h dans le sérum humain à 4 °C, 20 °C et 37 °C.**

Ces résultats montrent la bonne stabilité chimique du marquage à 4 °C, température à laquelle les enzymes présentes dans le sérum sont désactivées. La température physiologique de 37 °C permettant une activité normale des enzymes met en évidence une déshalogénéation légèrement plus importante. Toutefois celle-ci reste très limitée et montre la bonne stabilité du radiomarquage *in vitro*.

II-6. Conclusion

Le développement de précurseurs bifonctionnalisés spécifiques a permis de mettre en évidence la possibilité de radiomarquer des structures protéiques avec de l'astate-211 hypervalent. Les résultats les plus aboutis ont été obtenus avec un précurseur activé sous

forme de maléimide pouvant être couplé aux thiols des protéines, mais il devrait également être possible d'utiliser dérivés porteurs d'une fonction ester activé pour les couplages aux fonctions amine rendant ainsi la méthode accessible à un plus grand nombre de protéines. Des essais plus poussés avec de l'astate-211 en solution dans l'acétonitrile seront nécessaires pour la mise au point de cette seconde voie d'accès.

Le radiomarquage de la BSA par cette méthode à permis d'effectuer des tests de stabilité *in vitro* dans le sérum humain. Les formes monovalente et hypervalente se sont montrées stables après 12 heures d'incubation. La différence de stabilité observée entre les deux formes n'est pas significative, un test plus sévère est donc nécessaire pour pouvoir distinguer une différence entre ces deux formes, mais également pour évaluer leur éventuel intérêt par rapport à la référence de la littérature, le SAB. C'est pourquoi des tests de stabilité *in vivo* ont été initiés. En soumettant un anticorps radiomarké par cette méthode à des processus cataboliques chez l'animal vivant, l'intérêt de ce nouveau type de radiomarquage devrait pouvoir être évalué.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Malgré les tout premiers essais cliniques de radioimmunothérapie alpha prometteurs avec l'astate-211^{107,108}, le fait que l'administration des anticorps radiomarqués aient été réalisées par voie locale uniquement montre que le manque de stabilité des radiomarquages avec ce radionucléide est un obstacle important à une injection systémique et donc à un ciblage tumoral censé être l'essence même de la radioimmunothérapie. Ce constat montre la nécessité de trouver de nouvelles méthodologies de marquage des anticorps à l'astate-211. Un travail important de chimie et de biologie reste donc à réaliser pour approcher au plus près du concept de « Magic Bullet » développé par Paul Ehrlich, fondateur de l'immunologie, dont la vision était la création de composés capables de cibler précisément la maladie sans affecter les organes sains.

Les méthodes conventionnelles de radiomarquage des anticorps à l'astate-211 se font par l'intermédiaire de synthons contenant l'astate lié à un carbone aromatique. Hors, il a été démontré que ce type de structure subissait une importante déshalogénéation enzymatique *in vivo* conduisant à la libération d'astate-211 dans l'organisme. Quelques méthodes de radiomarquages ont émergé au cours de ces dix dernières années. L'utilisation de l'astate-211 sous forme de complexe avec le rhodium développée par M. Pruszyński est une méthode originale qui n'a toutefois pas encore été testée en termes de stabilité *in vivo*. Une méthodologie prometteuse consiste en la formation de liaisons bore-astate dans des structures de type cage de bore (carboranes, polyboranes, etc.). Si le gain de stabilité de ce type de liaison par rapport à la liaison carbone-astate a été démontré *in vivo*, les problèmes de modification du comportement biologique des anticorps radiomarqués à l'astate-211 par cette méthode perturbant la qualité du ciblage tumoral restent à élucider.

La nouvelle méthode de radiomarquage développée lors de ce travail de thèse fait intervenir l'astate sous forme hypervalente, contrairement à la méthode classique employant l'astate sous forme monovalente. En effet, sous forme hypervalente, les halogènes tendent à retourner à l'état monovalent, mais des méthodes permettant de stabiliser cet état d'oxydation supérieur ont été décrites. En particulier, l'utilisation de ligands électro-attracteurs et l'implication de l'atome hypervalent dans un cycle à cinq chaînons a permis l'obtention de λ^3 -iodanes stables. De par sa position dans le tableau périodique, nous avons supposé que l'astate, le dernier des halogènes, pouvait former des liaisons hypervalentes de stabilité supérieures à celles de l'iode puisque la stabilité de ces liaisons augmente dans la séquence $F < Cl < Br < I$. Si cette forme de l'astate est suffisamment stable *in vivo*, elle pourrait perturber les mécanismes de reconnaissance et de déshalogénéation enzymatiques se produisant sur les composés de l'astate monovalent.

Afin d'étudier la possibilité de former des espèces organiques hypervalentes de l'astate, un précurseur stannique spécifique a été conçu. Cet organostannique aromatique comporte un groupement hexafluoré électro-attracteur impliqué dans la formation de liaisons hypervalentes sous la forme d'un cycle à cinq chaînons incluant l'atome d'astate contribuant ainsi à la stabilisation.

L'accès à ces composés astatés a été étudié avec de l'astate-211 extraits par deux méthodes : la voie humide, qui consiste à attaquer à l'acide nitrique la cible de bismuth irradiée pour en extraire l'activité par de l'éther isopropylique et la voie sèche consistant à distiller l'astate-211 depuis la cible jusqu'au solvant de réaction par chauffage sous flux gazeux. Si l'extraction par voie humide présente l'avantage d'être simple à mettre en œuvre, elle est très peu employée dans les expérimentations décrites dans la littérature au profit de la voie sèche plus flexible. Celle-ci permet en effet de collecter l'activité dans le solvant de son choix contrairement à la voie humide qui impose l'extraction dans l'éther isopropylique.

Pourtant, la voie humide semble présenter un intérêt grandissant en raison de la meilleure reproductibilité d'extraction à haute activité et de sa simplicité de mise en œuvre en vue d'une automatisation. Ces deux facteurs se révèlent importants dans la perspective d'une introduction de l'astate-211 en clinique requérant hautes activités et radioprotection. Les travaux récents de Mickaël Bourgeois dans notre équipe ont ainsi permis de démontrer pour la première fois la faisabilité du radiomarquage d'un anticorps via le SAB radiomarké à l'astate-211 extrait par la voie humide¹⁴¹.

Cependant, cette méthode simple d'extraction qui a permis initialement l'accès à l'astate-211 dans notre laboratoire est apparue inadaptée à nos composés nécessitant de hautes températures pour l'étape d'astatodestannylation, celle-ci conduisant à la dégradation du précurseur en raison des concentrations élevées d'acide nitrique extraite avec l'astate-211 par l'éther isopropylique. Les premiers essais de radiomarquage avec de l'astate-211 extrait par voie sèche ont pu être réalisés au MHH à Hanovre. Ils ont permis l'obtention de rendements de radiomarquages élevés et la formation d'une première espèce hypervalente de l'astate-211 sous forme de bromoastatane. Cette technologie a ensuite été transférée dans notre laboratoire. La mise au point de la méthode de distillation a été réalisée conjointement avec le développement de nouvelles cible de bismuth sur support en nitrure d'aluminium et de techniques d'irradiation par le laboratoire Subatech et le cyclotron du CEMHTI.

Grace à cette méthode d'extraction de l'astate-211, la possibilité de former des composés astatés hypervalents a pu être mise en évidence pour la première fois. Les résultats reposent uniquement sur des analyses chromatographiques, comme pour tout

composé radiomarké à l'astate-211 publié jusqu'à présent en raison de l'absence d'isotopes stables. Les données obtenues, très proches de celles des références iodées, permettent de valider avec une bonne certitude l'existence de ces composés.

De par la position de l'astate dans le tableau périodique, les études de radiomarquage préliminaires sont généralement réalisées avec des isotopes de l'iode aux propriétés proches, plus faciles d'accès et plus pratiques à manipuler en raison de leurs demi-vies plus favorables (60 jours pour l'iode-125 et 8 jours pour l'iode-131 contre 7,2 heures pour l'astate-211). Ces modèles prédictifs peuvent toutefois se révéler inadaptés en raison de certaines différences de comportement de l'astate, comme son caractère métallique plus marqué. Ainsi cette différence de comportement a été observée lors des radiomarquages. S'il est possible d'effectuer l'étape de substitution électrophile avec l'astate-211 en 30 minutes, 2 heures sont nécessaires avec l'iode-125 dans les mêmes conditions. De plus, pour la formation des composés hypervalents, alors que le chloriodane est obtenu facilement, l'analogue astaté n'a pas pu être obtenu dans les mêmes conditions. La préparation des espèces de type chloroastatane n'a pu être réalisée en raison du manque de sources d'astate-211 pour approfondir les conditions à mettre en place.

Ce sont donc les structures de type bromoastatane qui ont été principalement étudiées en première approche. Le développement de précurseurs bifonctionnalisés permettant le couplage à des structures protéiques a été réalisé. Si la possibilité de former des composés hypervalents activés sous forme d'esters de N-succinimidyle pour le couplage aux lysines des anticorps a été démontrée, peu de sources d'astate-211 distillées en acétonitrile - solvant permettant de préserver l'ester activé lors de l'étape d'astatodestannylation – ont été obtenues. Le précurseur activé sous forme de maléimide pour le couplage aux cystéines a quant à lui reçu une plus grande attention en raison du plus grand nombre de cibles d'astate-211 distillées en méthanol.

Les formes monovalentes et hypervalente du précurseur ainsi marqué à l'astate-211 ont ensuite pu être couplées à la BSA, démontrant la conservation de la réactivité du groupement maléimide vis-à-vis des thiols suite aux deux étapes de radiosynthèse. Les tests de stabilité sériques réalisés sur la BSA ainsi radiomarkée ont montré une très faible déshalogénéation *in vitro*.

Toutefois, de nombreux composés radiomarkés à l'astate-211 décrits dans la littérature présentés comme étant stables *in vitro* se sont souvent révélés instables *in vivo* après injection systémique sur des animaux (souris le plus souvent). L'étape suivante concernant nos nouveaux composés sera donc l'étude comparative de la stabilité du

radiomarquage d'un anticorps par cette méthode avec la méthode de radiomarquage classique employant le SAB.

A l'exception des anticorps internalisés dans les cellules, les anticorps entiers radiomarqués à l'astate-211 via le SAB ne montrent généralement pas de déshalogénéation très prononcées *in vivo* en raison de leur catabolisme lent. En revanche, les fragments d'anticorps tels que les $F(ab')_2$ ou Fab' - qui ont des pharmacocinétiques adaptées à l'utilisation d'un émetteur alpha de courte demi-vie tel que l'astate-211 – montrent une déshalogénéation importante caractérisée par une accumulation de l'activité dans la thyroïde, l'estomac, la rate et les poumons qui sont les organes d'accumulation privilégiés de l'astate libre.

Des études *in vivo* ont donc été initiées avec l'anticorps F6. Il s'agit d'un anticorps murin ciblant l'ACE (antigène carcino-embryonnaire) qui a fait l'objet de plusieurs études cliniques et précliniques au sein de notre groupe de recherche et dont l'utilisation est aujourd'hui bien maîtrisée¹⁴². L'étude de biodistribution de ses fragments $F(ab')_2$ et Fab' radiomarqués à l'astate-211 via le SAB a été réalisée afin de choisir le modèle mettant le mieux en évidence l'instabilité du radiomarquage. Après injection à des souris par voie intraveineuse, les animaux ont été sacrifiés après 1 h, 4 h et 14 h et l'activité des organes mesurée. L'instabilité du radiomarquage est visible avec une augmentation de l'activité dans l'estomac et le cou (correspondant à la thyroïde) entre les points à 1 heure et 4 heures alors qu'elle diminue dans le sang et les autres organes non spécifiques de l'astate libre. Ce phénomène est plus marqué dans le cas du Fab' que du $F(ab')_2$ ce qui est en accord avec les observations de la littérature (Figure 61).

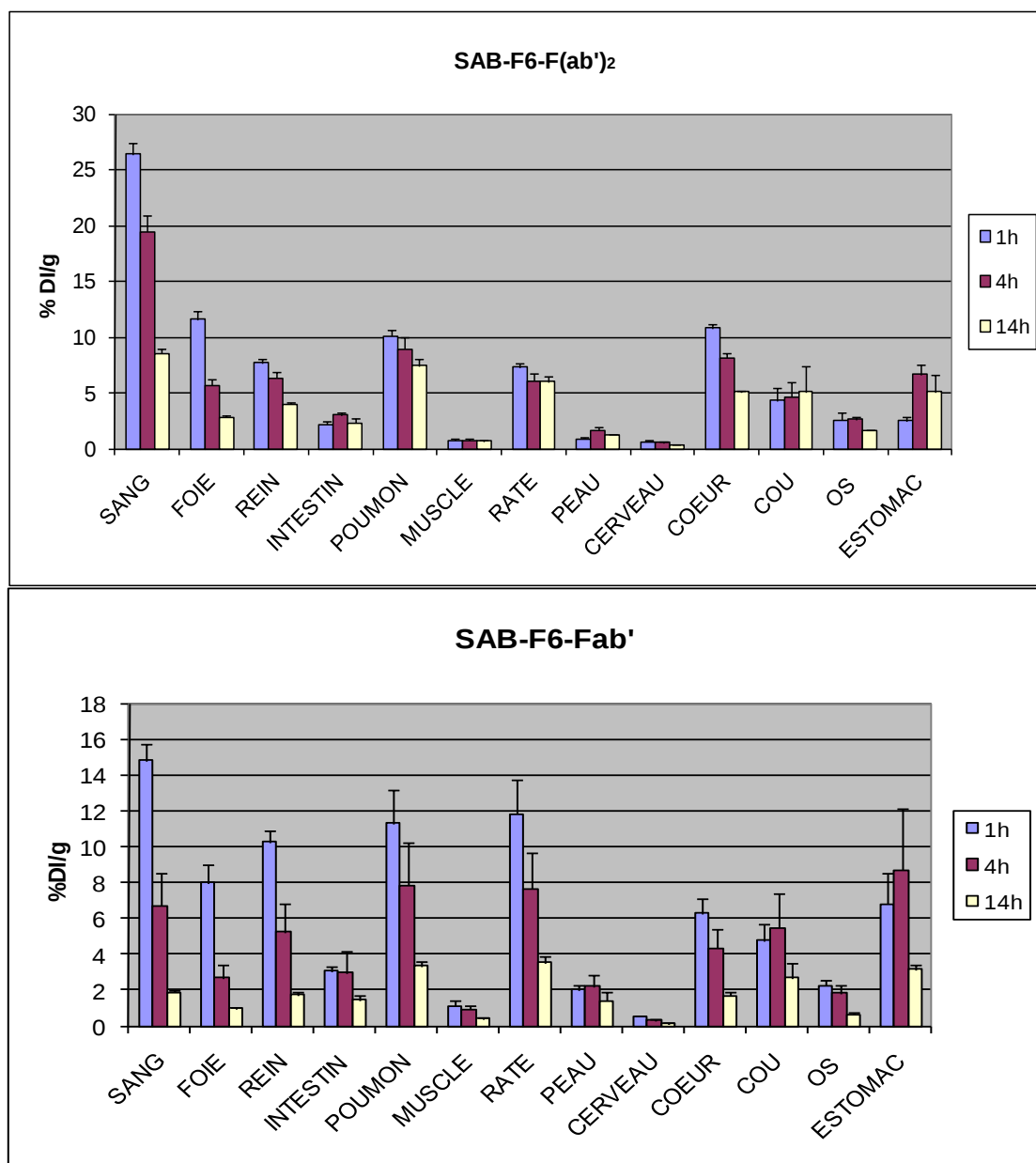


Figure 61 : Biodistribution des fragments F(ab')₂ (en haut) et Fab' (en bas) de l'anticorps F6 radiomarqué à l'astate-211 par l'intermédiaire du SAB injectés par voie intraveineuse sur des souris BALB/C.

L'instabilité étant plus marquée dans le cas du Fab', c'est celui-ci qui sera utilisé pour l'étude comparative. Il induira un test de stabilité plus sévère qu'avec le F(ab')₂, ce qui permettra de mieux distinguer les différences de stabilité entre le SAB, synthon de radiomarquage de référence et notre synthon portant l'astate-211 hypervalent bromé. Les contraintes de synthèse ont amené à l'obtention de composés dont les différences structurales avec le SAB ne se limitent pas qu'à l'état de valence de l'atome d'astate. Ainsi, afin de distinguer l'origine de la modification de stabilité susceptible d'être observée par rapport au SAB (hypervalence, présence de l'hexafluoroisopropanol fortement encombrant et/ou du linker permettant le couplage via le maléimide), la forme monovalente encombrée et

la forme monovalente ne portant pas de groupement hexafluoropropanol seront également incluses dans cette étude comparative de stabilité *in vivo* (Figure 62).

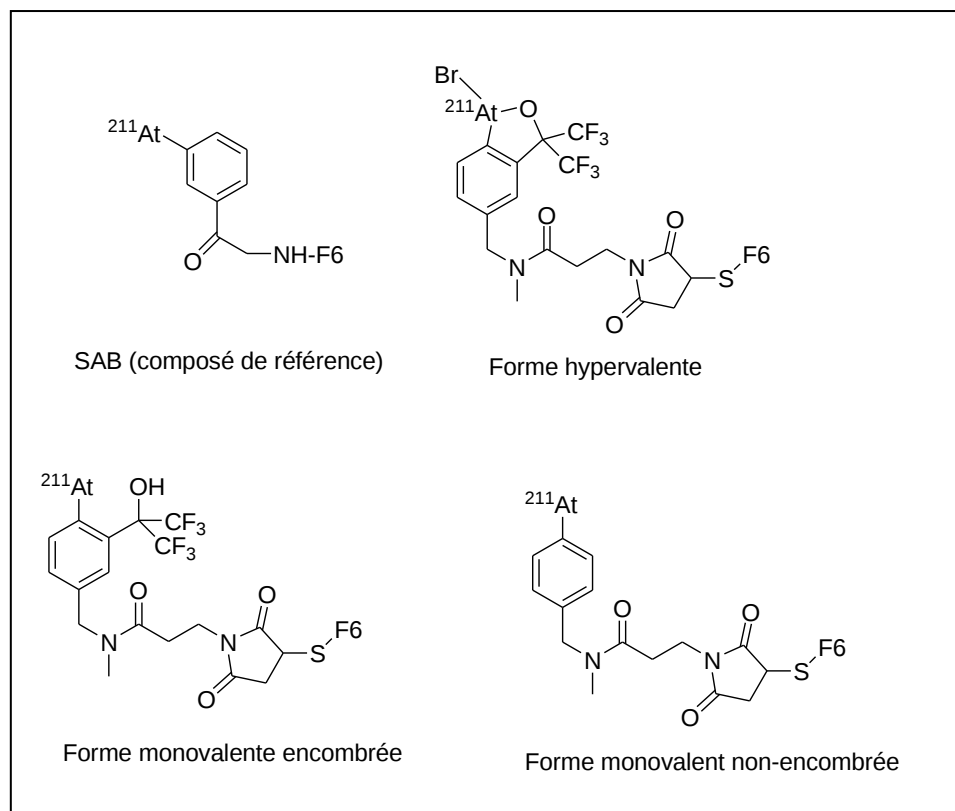


Figure 62 : Composés inclus dans l'étude de stabilité comparative en cours.

Les résultats fournis par cette étude de stabilité devraient nous permettre d'obtenir une réponse sur l'intérêt de ce type de radiomarquage. Des résultats positifs permettraient d'ouvrir la voie vers le développement de cette nouvelle méthodologie de marquage des anticorps à l'astate-211. Ainsi, si ce travail est une première étape qui a permis de mettre en évidence la possibilité de radiomarquer des anticorps à l'astate-211 hypervalent sous forme de bromoastatane cyclique, des améliorations pourront par la suite être apportées. Le ligand bidentate de Martin utilisé dans ces structures est un facteur déterminant pour l'obtention de composés stabilisés dans l'état hypervalent. La deuxième liaison hypervalente peut toutefois être modulée et le brome pourrait être avantageusement remplacé par d'autres groupements. L'utilisation du chlore, qui n'a pas abouti dans cette étude, ou d'autres groupements plus électronégatifs devrait permettre l'obtention d'une stabilisation supplémentaire.

Une autre perspective pourrait être la formation de composés hypervalents spirobicycliques. Certains atomes peu stables sous forme hypervalente tels que le brome ont pu être préparées et isolées par Nguyen en augmentant au maximum les facteurs stabilisant

dont la formation d'un deuxième cycle pour inclure l'atome hypervalent dans une structure spirobicyclique¹⁴³.

L'obtention d'analogues astatés de ce type de composé (Figure 63) est envisageable mais requerrait toutefois la préparation d'un précurseur stannique fortement encombré ce qui pourrait augmenter les difficultés d'introduction de l'astate-211 et exiger des conditions de radiomarquage plus dures que celles employées avec nos précurseurs actuels.

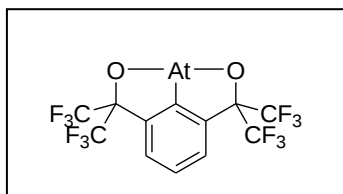


Figure 63 : Structure spirobicyclique de l'astate hypervalent qui permettrait d'obtenir une stabilité supplémentaire des liaisons hypervalentes.

Cette méthode originale est donc un nouvel outil potentiel de radiomarquage des anticorps à l'astate-211. Ces travaux font partie d'un ensemble de projets initiés avec la mise en place du cyclotron ARRONAX à Nantes dont les caractéristiques permettront la production de doses thérapeutiques d'astate-211. La meilleure disponibilité de ce radioisotope prometteur devrait ainsi permettre d'améliorer dans les prochaines années la connaissance de ses propriétés en associant les compétences de la physique, de la biologie, de la chimie et de la médecine et d'accélérer son introduction en clinique pour le traitement des cancers.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. Synthèses chimiques

Produits commerciaux :

Les réactifs sont obtenus chez Aldrich à l'exception de l'hexafluoroacétone sesquihydratée, des solutions de N-butyllithium et de N-méthylamine fournis par Acros.

Solvants :

Les solvants sont obtenus chez SDS. Lorsqu'ils sont précisés anhydres dans les protocoles, les solvants sont distillés sous atmosphère d'argon sur sodium/benzophénone (THF, dioxane), chlorure de calcium (ACN, dichlorométhane), ou hydruure de calcium (N,N-diisopropyléthylamine) avant utilisation à l'exception du DMF anhydre qui est obtenu chez Aldrich et conservé sous atmosphère d'azote ou d'argon.

Spectroscopie RMN :

Les spectres RMN ^1H sont enregistrés à 250 ou 400 MHz sur des spectromètres Bruker AC-250 ou AC-400. Les spectres RMN ^{13}C sont enregistrés à 100 MHz sur Bruker AC-400. Les déplacements chimiques δ des spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C sont donnés en ppm relatifs au signal des protons ou des carbones résiduels des solvants CDCl_3 ($\delta = 7.27, 77.16$), $\text{DMSO-}d_6$ ($\delta = 2.50, 39.52$), CD_3CN ($\delta = 1.94, 1.32$), CD_3OD ($\delta = 3.31, 49.00$), Acétone- d_6 ($\delta = 2.04, 29.84$). Les constantes de couplage sont données en Hertz (Hz) et se réfèrent aux multiplicités apparentes indiquées par les abréviations suivantes : s (singulet), d, (doublet), t (triplet), q (quadruplet), sept (septuplet), dd (doublet de doublets), dt (doublet de triplets), m (multiplet), dm (doublet de multiplets).

Spectrométrie de masse :

Les spectres de masse sont enregistrés sur un spectromètre de masse Bruker Esquire LC avec ionisation par électrospray et analyseur à trappe d'ions en mode positif et/ou négatif.

Chromatographie :

Les chromatographies sur couche mince (CCM) sont réalisées sur des plaques de silice 60 Å avec révélateur fluorescent à 254 nm sur support plastique. Elles sont révélées sous

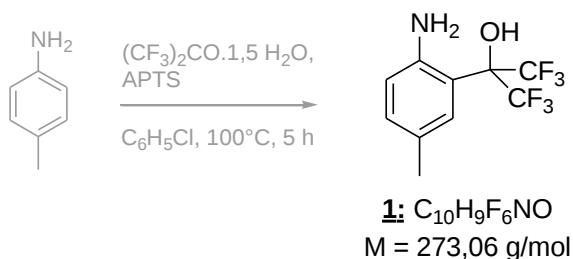
lampe UV à 254 nm, à l'iode ou pour les amines à la ninhydrine. La valeur des R_f est donnée à titre indicatif, l'éluant utilisé étant noté entre parenthèses.

Les chromatographies sur colonne sont effectuées avec de la silice 60 Å 40-63 µm (SDS) et poussées à l'air comprimé (chromatographie éclair).

Les chromatographies liquides haute performance (CLHP) sont réalisées sur un appareil Waters 600 HP System équipé d'un détecteur UV à double longueur et d'onde réglé à 254 nm et 280 nm. La colonne utilisée est une Waters spherisorb S5W 4.6 x 250mm Analytical column éluee selon le gradient suivant : Heptane/AcOEt (99,75/0,25) sur les dix premières minutes puis gradient jusqu'à 100 % d'AcOEt sur les dix minutes suivantes avec un débit de 1,3 mL/min.

Points de fusion :

Les points de fusions sont réalisés sur un appareil à point de fusion numérique SMP10 fourni par Stuart BioCote avec une précision de ± 1 °C pour 20 °C à $\pm 2,5$ °C pour 300 °C.

2-(2-amino-5-méthylphényl)-1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-ol (1):

A une solution de para-toluidine (14,6 g, 136 mmol) dans 25 mL de chlorobenzène est ajouté l'acide paratoluènesulfonique monohydraté (395 mg, 2,05 mmol). Le milieu réactionnel est chauffé à 100 °C et la 1,1,1,3,3,3-hexafluoroacétone sesquihydratée (41,4 g, 219 mmol) est ajoutée goutte à goutte sur 45 minutes à l'aide d'une ampoule à brome. Le milieu est agité 5 h à 100°C. Après évaporation du solvant sous vide, le résidu est repris dans 300 mL de chloroforme et placé une nuit à -20 °C. Les cristaux formés sont filtrés et lavés avec du chloroforme glacé pour donner 28,2 g d'aiguilles incolores (103,4 mmol, 76 % rdt) après séchage une nuit sous cloche à vide.

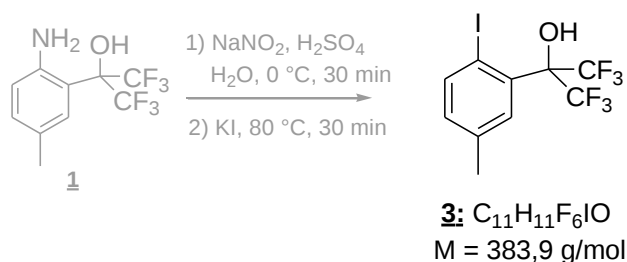
RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ 2,36 (s, 3H) ; 6,97 (d, 1H, J = 7,93 Hz) ; 7,18 (d, 1H, J = 7,93 Hz) ; 7,39 (s, 1H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 21,0 ; 79,9 (sept, ²J_{C-F} = 30 Hz) ; 122,8 ; 123,4 (q, ¹J_{C-F} = 286 Hz) ; 127,2 ; 128,9 (sept, ³J_{C-F} = 2 Hz) ; 131,1 ; 135,1 ; 138,6.

MS (ES⁺) *m/z* 274,0 [M+H]⁺, 256,0 [M+H-H₂O]⁺.

Rf (CH₂Cl₂) : 0,45.

T_f : 111 °C.

1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(2-iodo-5-methylphenyl)propan-2-ol (3)

Au composé **1** (2 g, 7,32 mmol) en suspension dans 20 mL d'eau distillée refroidie dans un bain d'eau glacée est ajouté 0,5 mL d'acide sulfurique. Le nitrite de sodium (505 mg, 7,32 mmol) dissous dans 2,5 mL d'eau est ajouté goutte à goutte puis 0,5 mL d'acide sulfurique supplémentaire est ajouté. Le milieu est agité à 0 °C jusqu'à complète dissolution de la suspension (environ 30 min). La solution est ensuite ajoutée goutte à goutte pendant une trentaine de minutes sur l'iodure de potassium (1,46 g, 8,78 mmol) en solution dans 5 mL d'eau glacée. Le milieu réactionnel est ensuite chauffé à 80 °C jusqu'à l'arrêt de dégagement d'azote (environ 30 min). Après retour à température ambiante, la suspension rouge est filtrée, lavée à l'eau puis dissoute dans 50 mL d'éther diéthylique. La solution est lavée par 20 mL d'eau puis par 20 mL d'acide chlorhydrique 1N. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et concentrée sous vide. Le résidu obtenu est purifié sur silice (éluant heptane/chloroforme (1/1)) pour donner 1,98 g d'une huile jaune (5,16 mmol, 71 % rdt) qui solidifie après une nuit à 4 °C.

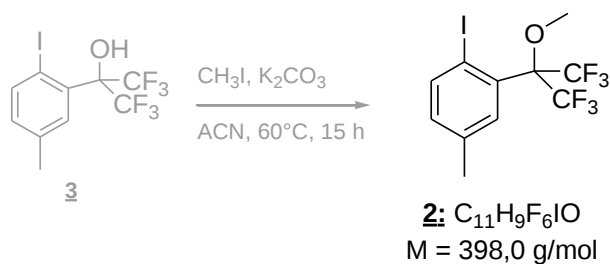
RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ 2,35 (s, 3H) ; 6,93 (d, 1H, J = 8,24 Hz) ; 7,42 (s, 1H) ; 7,98 (d, 1H, J = 8,24 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 21,1 ; 78,7 (sept, ²J_{C-F} = 30 Hz) ; 86,4 ; 122,6 (q, ¹J_{C-F} = 289 Hz) ; 129,5 ; 130,7 ; 132,5 ; 138,3 ; 144,3.

MS (ES-) m/z 382,8 [M-H]⁻.

R_f (Heptane/CHCl₃ : 1/1) : 0,59.

T_f : 42 °C.

2-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-methoxypropan-2-yl)-1-iodo-4-methylbenzene (2)

Le composé **3** (3 g, 7,81 mmol) est dissous dans 50 mL d'ACN anhydre sous atmosphère d'azote. Le carbonate de potassium (2,16 g, 15,6 mmol) puis l'iodométhane (2,38 mL, 15,6 mmol) sont ajoutés et le milieu est porté à 60 °C pendant 15 heures. Le solvant est évaporé sous vide et le résidu repris dans 50 mL de dichlorométhane et les sels sont filtrés. Le filtrat est lavé par 2 fois 20 mL d'eau et la phase organique est séchée sur sulfate de sodium. Le solvant est évaporé sous vide pour donner un solide jaune pâle (2,98 g, 7,49 mmol, 96 % rdt).

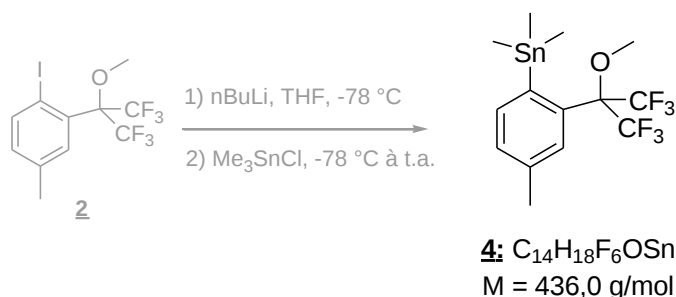
RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ 2,36 (s, 3H) ; 3,54 (s, 3H) ; 6,92 (d, 1H, J = 7,93 Hz) ; 7,33 (s, 1H) ; 8,05 (d, 1H, J = 7,93 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 21,1 ; 54,9 ; 84,0 (sept, ²J_{C-F} = 30 Hz) ; 88,3 ; 122,5 (q, ¹J_{C-F} = 291 Hz) ; 128,8 ; 132,2 (sept, ³J_{C-F} = 2 Hz) ; 132,3 ; 138,2 ; 144,8.

MS (ES⁺) *m/z* 399,3 [M+H]⁺.

R_f (Heptane/Acétone : 95/5) : 0,74.

T_f : 77 °C.

(2-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-methoxypropan-2-yl)-4-methylphenyl)trimethylstannane (4)

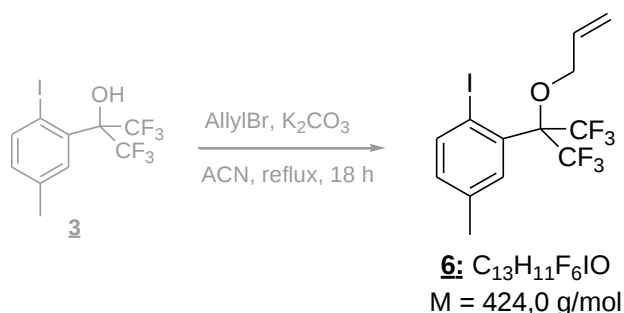
Le composé **2** (500 mg, 1,25 mmol) est dissous dans 75 mL de THF anhydre sous azote et le milieu est refroidi à -78 °C par un bain acétone/carboglance et le n-butyllithium (1,12 mL, 1,88 mmol, 1,6 M en hexanes) est ajouté goutte à goutte. Le milieu est agité 30 min à -78 °C puis le chlorure de triméthylétain (375 mg, 1,88 mmol) en solution dans 15 mL de THF anhydre sous azote est ajouté. Le milieu est laissé remonter progressivement à t.a. sur la nuit. 50 mL d'une solution de chlorure d'ammonium 0,1 M sont ajoutés avec précaution et le milieu est extrait par 3 fois 50 mL de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de sodium et concentrées sous vide. Le résidu est purifié sur silice (éluant : heptane) pour donner 171 mg d'une huile incolore (392 µmol, 31 % rdt).

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ 0,26 (s, 9H + d couplage ¹¹⁹Sn-H) ; 2,38 (s, 3H) ; 3,80 (s, 3H) ; 7,24 (d, 1H, J = 7,63 Hz) ; 7,49 (s, 1H) ; 7,56 (d, 1H, J = 7,63 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ -6,0 ; 21,4 ; 55,9 ; 81,5 (sept, ²J_{C-F} = 30 Hz), 122,9 (q, ¹J_{C-F} = 290 Hz) ; 128,9 ; 130,0 ; 134,8 ; 137,3 ; 137,5 ; 137,7 ; 138,4.

MS (ES⁺/ES⁻) pas d'ionisation.

R_f (Heptane) : 0,61.

2-(2-(allyloxy)-1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-yl)-1-iodo-4-méthylbenzène (6)

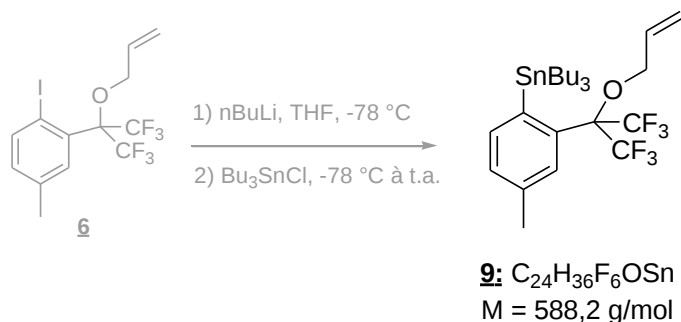
Le composé **3** (1,07 g, 2,79 mmol) est dissous dans 25 mL d'ACN anhydre sous azote et le carbonate de potassium puis le bromure d'allyle sont introduits et le milieu porté à reflux pendant 18 h. L'acétonitrile est évaporé sous vide et le résidu repris dans du dichlorométhane et les sels sont filtrés. Le résidu est purifié sur silice (éluant : heptane) pour donner 1,12 g d'une huile incolore (2,64 mmol, 95 % rdt).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2,35 (s, 3H) ; 4,19 (d, 2H, J = 5,2 Hz) ; 5,30 (dm, 1H, J = 10,8 Hz) ; 5,42 (dm, 1H, J = 17,2 Hz) ; 6,11-6,21 (m, 1H) ; 6,91 (d, 1H, J = 8,0 Hz) ; 7,33 (s, 1H) ; 8,05 (d, 1H, J = 8,0 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 21,1 ; 67,9 ; 88,6 ; 118,4 ; 122,6 (q, ¹J_{C-F} = 292 Hz) ; 129,2 ; 132,2 ; 132,2 ; 132,7 ; 138,0 ; 144,9

MS (ES⁺/ES⁻) pas d'ionisation.

R_f (Heptane) : 0,73.

Tributyl(2-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(vinylloxy)propan-2-yl)-4-méthylphényl)stannane (9)

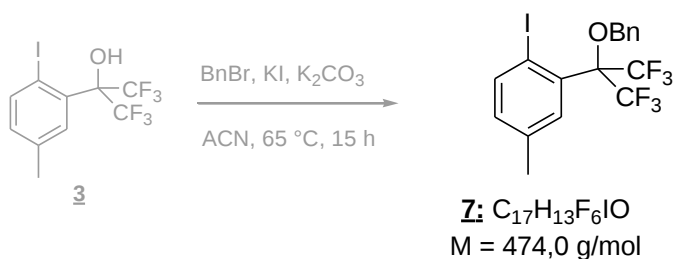
Le composé **5** (207 mg, 488 μ mol) est dissous dans 5 mL de THF anhydre sous azote et le milieu est refroidi à -78 °C par un bain acétone/carboglance et le n-butyllithium (265 μ L, 976 μ mol, 1,6 M en hexanes) est ajouté goutte à goutte. Le milieu est agité 30 min à -78 °C puis le chlorure de tributylétain (1 mL, 976 μ mol) en solution dans 3 mL de THF anhydre sous azote est ajouté. Le milieu est laissé remonter progressivement à t.a. sur la nuit. 3 mL d'une solution de chlorure d'ammonium 0,1 M sont ajoutés avec précaution et le milieu est extrait par 2 fois 20 mL de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, lavées par 10 mL d'une solution de fluorure de potassium saturée, séchées sur sulfate de sodium et concentrées sous vide. Le résidu est purifié sur silice (éluant : heptane) pour donner 181 mg d'une huile incolore (308 μ mol, 63 % rdt).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 0,89 (t, 9H, J = 7,2 Hz) ; 1,06-1,55 (m, 18 H) ; 2,38 (s, 3H) ; 4,33 (d, 2H, J = 5,9 Hz) ; 5,24-5,33 (m, 2H) ; 5,98 (m, 1H) ; 7,22 (d, 1H, J = 7,4 Hz) ; 7,42 (s, 1H) ; 7,51 (d, 1H, J = 7,4 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 12,8 ; 13,6 ; 21,4 ; 27,4 ; 29,1 ; 69,0 ; 83,6 (sept, ²J_{C-F} = 27 Hz) ; 118,3 ; 123,1 (q, ¹J_{C-F} = 290 Hz) ; 129,6 ; 129,8 ; 133,1 ; 134,5 ; 137,2 ; 138,2 ; 140,5.

MS (ES+/ES-) pas d'ionisation.

R_f (Heptane) : 0,64.

1-((1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(2-iodo-5-méthylphényl)propan-2-yloxy)méthyl)benzène (7)

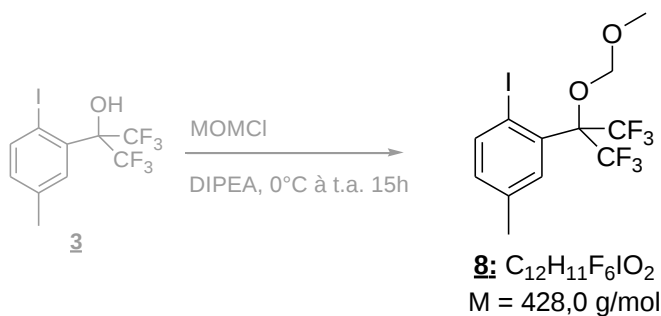
Le composé **2** (1,50 g, 3,90 mmol) est dissous dans 40 mL d'acétonitrile anhydre sous azote, puis le carbonate de potassium, l'iodure de potassium et le bromure de benzyle sont introduits. Le milieu est porté à 65 °C pendant 15 h. Le solvant est évaporé sous vide, le résidu repris dans 50 mL de dichlorométhane et les sels sont filtrés. Après évaporation du solvant sous vide, le résidu est purifié sur silice (heptane/acétone : 95/5) pour donner 1,76 g d'une huile incolore (3,69 mmol, 95 % rdt).

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ 2,38 (s, 3H) ; 4,79 (s, 2H) ; 6,95 (d, 1H, J = 7,5 Hz) ; 7,34 (m, 5H) ; 7,50 (s, 1H) ; 8,08 (d, 1H, J = 7,5 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 21,2 ; 68,2 ; 83,9 (sept, ²J_{C-F} = 28 Hz) ; 122,7 (q, ¹J_{C-F} = 291 Hz) ; 128,0 ; 128,1 ; 128,2 ; 129,2 ; 132,1 ; 132,4 ; 136,3 ; 138,1 ; 145,0.

MS (ES⁺/ES⁻) pas d'ionisation.

Rf (Heptane/Acétone : 9/1) : 0,69.

2-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(méthoxyméthoxy)propan-2-yl)-1-iodo-4-méthylbenzène (8)

Le composé **3** (4 g, 10,42 mmol) est dissous sous azote dans 20 mL de DIPEA fraîchement distillée. La solution est refroidie dans un bain d'eau glacée et le chlorométhyl méthyl éther (4,75 mL, 62,5 mmol) est ajouté. Un précipité blanc apparaît instantanément. Le milieu réactionnel est agité une nuit à température ambiante. Après évaporation du DIPEA sous vide, le résidu est purifié sur silice (éluant : Heptane/Acétone : 95/5) pour donner 4,23 g d'un solide légèrement jaune (9,89 mmol, 95 % rdt).

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ 2,35 (s, 3H) ; 3,56 (s, 3H) ; 5,03 (s, 2H) ; 6,92 (d, 1H, J = 7,93 Hz) ; 7,40 (s, 1H) ; 8,07 (d, 1H, J = 7,93 Hz).

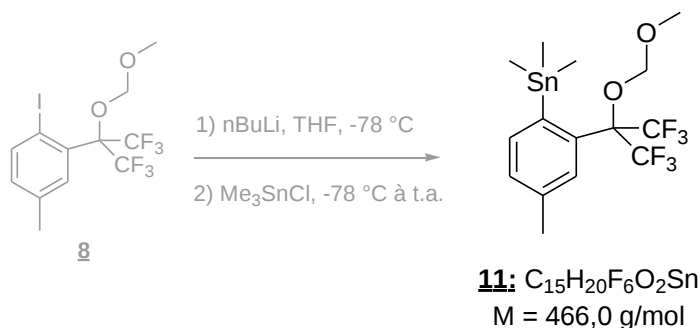
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 21,2 ; 57,1 ; 83,5 (septet, ²J_{C-F} = 29 Hz) ; 88,7 ; 95,0 ; 122,6 (q, ¹J_{C-F} = 291 Hz) ; 126,9 ; 129,5 ; 132,4 ; 132,5 ; 138,3 ; 145,0.

MS (ES⁺/ES⁻) pas d'ionisation.

T_f : 47 °C.

R_f (Heptane/Acétone : 9/1) : 0,75.

(2-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(méthoxyméthoxy)propan-2-yl)-4-méthylphényl)triméthylstannane (11)



Le composé **8** (2,044 g, 4,77 mmol) est dissous dans 35 mL de THF anhydre sous azote et le milieu est refroidi à -78 °C par un bain acétone/carboglance et le n-butyllithium (4,45 mL, 7,16 mmol, 1,6 M en hexanes) est ajouté goutte à goutte. Le milieu est agité 30 min à -78 °C puis le chlorure de triméthylétain (1,427 g, 7,16 mmol) en solution dans 15 mL de THF anhydre sous azote est ajouté. Le milieu est laissé remonter progressivement à t.a. sur la nuit. 10 mL d'une solution de chlorure d'ammonium 0,1 M sont ajoutés avec précaution et le milieu est extrait par 2 fois 50 mL de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, lavées par 20 mL d'une solution de fluorure de potassium saturée, séchées sur sulfate de sodium et concentrées sous vide. Le résidu est purifié sur silice (éluant : heptane/DCM : 95/5) pour donner 879 mg d'un solide blanc (1,89 mmol, 40 % rdt).

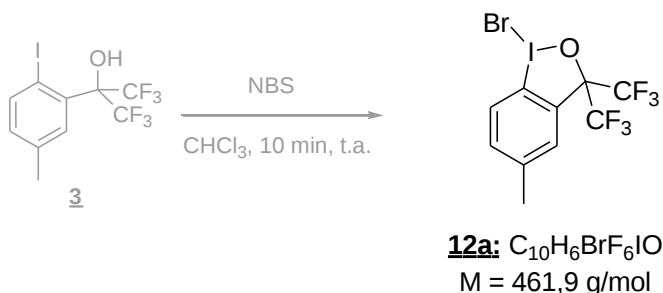
RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ 0,31 (s, 9H) ; 2,38 (s, 3H) ; 3,52 (s, 3H) ; 5,00 (s, 2H) ; 7,24 (d, 1H, J = 7,6 Hz) ; 7,45 (s, 1H) ; 7,54 (d, 1H, J = 7,6 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ -5,1 ; 21,4 ; 57,4 ; 94,9 ; 122,8 (q, ¹J_{C-F} = 288 Hz) ; 129,2 ; 130,1 ; 134,1 ; 137,7 ; 137,9 ; 140,8.

MS (ES+/ES-) pas d'ionisation.

T_f : 41 °C.

R_f (Heptane/Acétone : 99/1) : 0,68.

1-Bromo-1,3-dihydro-5-méthyl-3,3-bis(trifluorométhyl)-1,2-benziodoxole (12a)

Le composé **3** (100 mg, 0,26 mmol) est dissous dans 5 mL de chloroforme et la N-bromosuccinimide (47 mg, 0,26 mmol) est ajoutée. Le milieu réactionnel est agité 10 min à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu est purifié sur silice (éluant : DCM) pour donner 111 mg d'un solide jaune (0,26 mmol, 92 % rdt).

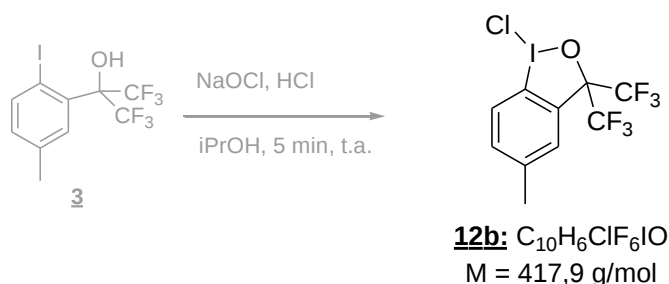
RMN 1H (250 MHz, $CDCl_3$) 2,56 (s, 3H) ; 7,47 (s, 1H) ; 7,61 (d, 1H, $J = 8,6 \text{ Hz}$) ; 7,87 (d, 1H, $J = 8,6 \text{ Hz}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 20,9 ; 84 ; 106,3 ; 122,8 (q, $^1J_{C-F} = 288 \text{ Hz}$) ; 129,5 ; 130,2 ; 132,4 ; 134,6 ; 142,9.

MS (ES-) m/z 460,4/462,4 $[M-H]^-$; 382,3 $[M-Br]^-$.

T_f : 192 °C.

R_f (Heptane/Acétone : 9/1) : 0,49.

1-chloro-1,3-dihydro-5-méthyl-3,3-bis(trifluorométhyl)-1,2-benziodoxole (12b)

Le composé **2** (60 mg, 156 μmol) est dissous dans 2 mL d'isopropanol, puis 10 μL d'acide chlorhydrique 37 % et 50 μL d'hypochlorite de sodium (10-15 %) sont ajoutés. Un précipité blanc apparaît instantanément. Le milieu réactionnel est agité 5 min à température ambiante et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est purifié sur gel de silice pour donner 50 mg d'un solide blanc (119 μmol , 76 % rdt).

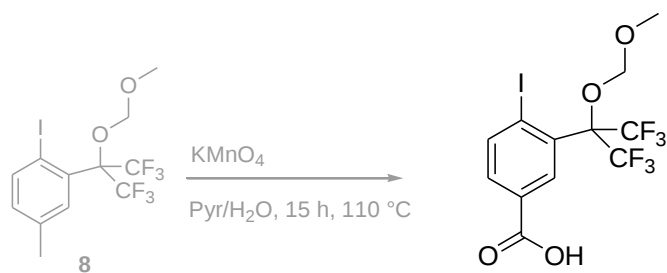
RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ 2,56 (s, 3H) ; 7,51 (s, 1H) ; 7,64 (d, 1H, $J = 8,85 \text{ Hz}$) ; 7,92 (d, 1H, $J = 8,85 \text{ Hz}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 21,0 ; 85,0 ; 109,8 ; 122,9 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 287 \text{ Hz}$) ; 128,1 ; 130,3 ; 132,0 ; 134,8 ; 134,6 ; 142,7.

MS (ES+) m/z 384,8 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

T_f : 177 $^\circ\text{C}$.

R_f (Heptane/Acétone : 9/1) : 0,48.

Acide 3-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(méthoxyméthoxy)propan-2-yl)-4-iodobenzoïque (17)

17: C₁₂H₉F₆IO₄
M = 458,0 g/mol

Le composé **8** (1,5 g, 3,5 mmol) est dissous dans un mélange de 10 mL de pyridine et 3 mL d'eau et le permanganate de potassium (2,215 g, 14,02 mmol) est ajouté. Le milieu est chauffé 15 h à 110 °C puis filtré à chaud. Le précipité est lavé par 20 mL d'une solution de KOH 5 % préalablement chauffée à 80 °C. Le filtrat est acidifié à pH 1 par ajout d'une solution d'HCl 6N, puis extrait par 2 fois 50 mL d'acétate d'éthyle. Après séchage sur sulfate de sodium et évaporation du solvant sous vide, le résidu obtenu est purifié sur silice (éluant : chloroforme). Après évaporation des fractions d'intérêt, le résidu est repris dans 10 mL de carbonate de potassium 0,1M. La solution est lavée par 2 fois 5 mL d'acétate d'éthyle puis acidifiée à pH 2 par du HCl 1N. La phase aqueuse est extraite par deux fois 10 mL d'acétate d'éthyle, les phases organiques rassemblées et séchées sur sulfate de sodium et évaporées pour donner 694 mg d'un solide blanc (1,52 mmol, 43 % rdt).

RMN ¹H (250 MHz, (CD₃)₂CO) δ 3,52 (s, 3H) ; 5,09 (s, 2H) ; 7,81 (d, 1H, J = 8,25 Hz) ; 8,31 (s, 1H) ; 8,47 (d, 1H, J = 8,25 Hz).

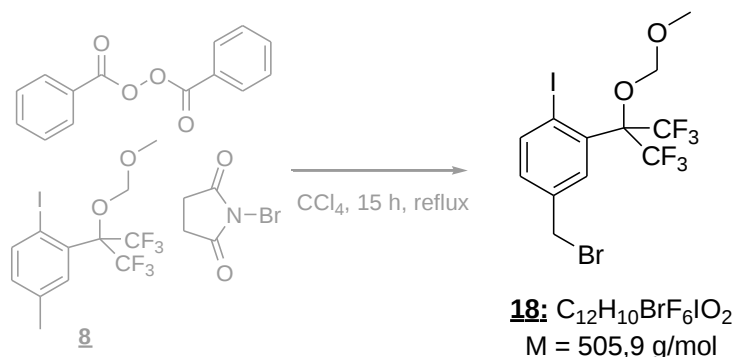
RMN ¹³C (100 MHz, (CD₃)₂CO) δ 57,2 ; 84,5 (sept, ²J_{C-F} = 27 Hz) ; 99,9 ; 123,6 (q, ¹J_{C-F} = 291 Hz) ; 130,9 ; 131,7 ; 132,8 ; 133,0 ; 147,2 ; 166,3.

MS (ES-) m/z 457,0 [M-H]⁻.

T_f: 150 °C.

R_f (dichlorométhane) : 0,37.

4-(bromométhyl)-2-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(méthoxyméthoxy)propan-2-yl)-1-iodobenzène (18)



Le composé **8** (2,51 g, 5,86 mmol), le peroxyde de benzoyle (57 mg, 256 µmol) et la N-bromosuccinimide (1,038 g, 8,79 mmol) sont dissous dans 25 mL de tétrachlorure de carbone. Le milieu est dégazé sous vide, placé sous atmosphère d'azote et chauffé 15 h à reflux. Après retour à température ambiante, le précipité est filtré et lavé par du tétrachlorure de carbone. Le filtrat est concentré sous vide et le résidu obtenu est purifié sur silice (éluant : heptane/acétone : 95/5) pour donner 2,27 g d'un solide blanc (4,48 mmol, 76 % rdt).

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ 3,57 (s, 1H) ; 4,43 (s, 2H) ; 5,03 (s, 2H) ; 7,15 (d, 1H, J = 8,2 Hz) ; 7,58 (s, 1H) ; 8,18 (d, 1H, J = 8,2 Hz).

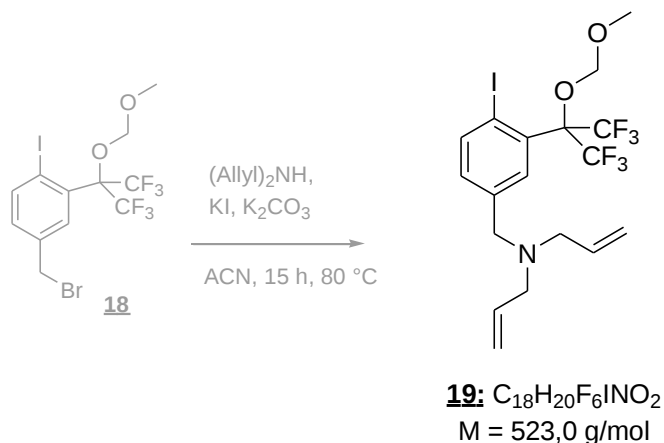
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 31,5 ; 57,1 ; 83,3 (sept, ²J_{C-F} = 29 Hz) ; 92,5 ; 95,1 ; 122,5 (q, ¹J_{C-F} = 291 Hz) ; 130,4 ; 131,8 ; 132,0 ; 142,2 ; 145,9.

MS (ES⁺/ES⁻) pas d'ionisation.

T_f : 43 °C.

R_f (Heptane/Acétone : 95/5) : 0,31.

N-allyl-N-(3-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(methoxymethoxy)propan-2-yl)-4-iodobenzyl)prop-2-en-1-amine (19)

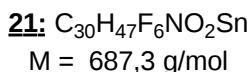


Le composé **18** (1,07 g, 2,11 mmol) est dissous dans 20 mL d'acétonitrile anhydre sous azote puis le carbonate de potassium (583 mg, 4,22 mmol), l'iodure de potassium (350 mg, 2,11 mmol) et la diallylamine (2,6 mL, 21,1 mmol) sont ajoutés et le milieu réactionnel porté 15 h à 80 °C. Après retour à température ambiante, les sels sont filtrés et le filtrat concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur silice (éluant : heptane/acétone : 9/1) pour donner 936 mg d'une huile jaune ((1,79 mmol, 85 % rdt).

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ 3,07 (d, 4H, J = 6,4 Hz) ; 3,57 (s, 5H) ; 5,03 (s, 2H) ; 5,13-5,22 (m, 4H) ; 5,76-5,92 (m, 2H) ; 7,07 (d, 1H, J = 8,2 Hz) ; 7,65 (s, 1H) ; 8,12 (d, 1H, 8,2 Hz).

MS (ES⁺) *m/z* 524,0 [M+H]⁺.

R_f (Heptane/Acétone : 9/1) : 0,40.

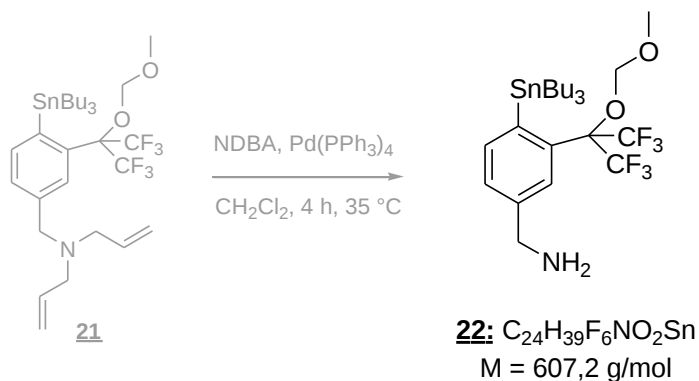


RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ 0,89 (t, 9H, J = 7,0 Hz) ; 1,08 (t, 6H, J = 8,3 Hz) ; 1,28-1,47 (m, 12H) ; 3,08 (d, 4H, J = 6,1 Hz) ; 3,52 (s, 3H), 3,6 (s, 2H) ; 4,89 (s, 2H) ; 5,13-5,23 (m, 4H) ; 5,78-5,95 (m, 2H) ; 7,35 (d, 1H, 7,6 Hz) ; 7,54 (d, 1H, J = 7,6 Hz) ; 7,63 (s, 1H).

MS (ES+) m/z 688,2 $[M+H]^+$, 398,2 $[M+2H-SnBu_3]^+$.

147

(3-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(methoxymethoxy)propan-2-yl)-4-(tributylstannyl)phenyl)methanamine (22)



Le composé **21** (622 mg, 906 µmol) est dissous dans 10 mL de dichlorométhane est la solution est dégazée par bullage d'azote pendant 15 min. La solution est alors ajoutée à l'acide N,N-diméthylbarbiturique (849 mg, 5,44 mmol) et au Tétrakis(triphénylphosphine)palladium(0) (21 mg 18,1 µmol) préalablement placés sous azote dans un bicol surmonté d'un réfrigérant. Le milieu réactionnel est porté à 35 °C pendant 4 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu repris dans 20 mL d'éther diéthylique, lavé par 3 fois 10 mL de carbonate de sodium 0,1 M. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et concentrée sous vide. Le résidu obtenu est purifié sur silice (éluant : DCM/ MeOH : 95/5) pour donner 423 mg d'une huile légèrement jaune (698 µmol, 77 % rdt).

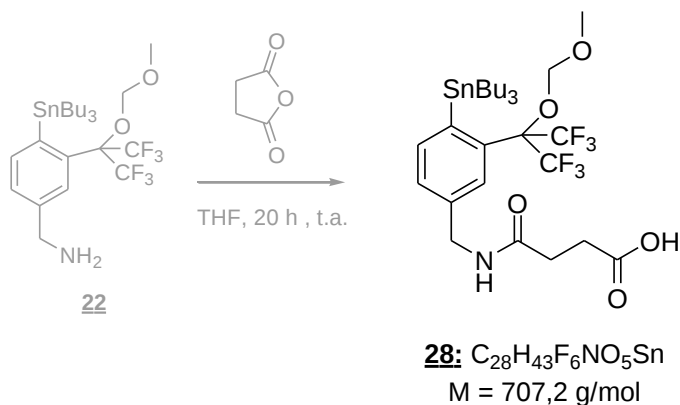
RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ 0,89 (t 9H, J = 7,0 Hz) ; 1,08 (t, 6H, J = 8,3 Hz) ; 1,28-1,50 (m, 12H) ; 1,98 (s, 2H) ; 3,52 (s, 3H) ; 3,91 (s, 2H) ; 4,88 (s, 2H) ; 7,38 (d, 1H, J = 6,7Hz) ; 7,56-7,60 (m, 2H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 12,9 ; 13,6 ; 27,4 ; 29,0 ; 57,2 ; 83,0 (m) ; 122,7 (q, ¹J_{C-F} = 290 Hz) ; 127,9 ; 128,1 ; 134,7 ; 138,8 ; 144,2.

MS (ES⁺) m/z 608,1 [M+H]⁺.

Rf (CH₂Cl₂/MeOH : 9/1) : 0,23.

Acide 4-(3-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(méthoxyméthoxy)propan-2-yl)-4-(tributylstannyl)benzylamino)-4-oxobutanoïque (28)



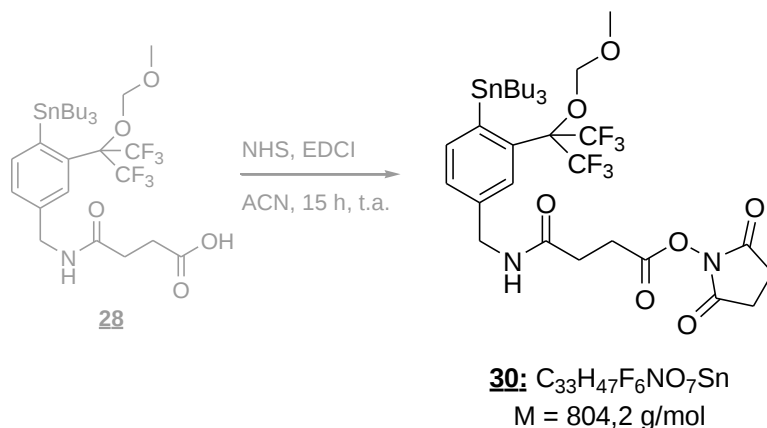
Le composé **28** (401 mg, 661 μ mol) est dissous dans 5 mL de THF anhydre sous azote et l'anhydride succinique (165 mg, 1,65 mmol) est ajouté. Après 20 h d'agitation à température ambiante, le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu dissous dans le n-hexane. Le précipité blanc formé est éliminé par filtration et le filtrat évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur silice (éluant : CH₂Cl₂/MeOH: 9/1) pour donner 461 mg d'un solide blanc (661 μ mol, 99 % rdt).

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ 0,89 (t, 9H, J = 7,0 Hz) ; 1,09 (t, 6H, J = 8,2 Hz) ; 1,28-1,50 (m, 12H) ; 2,57 (t, 2H, J = 7,0 Hz) ; 2,76 (t, 2H, J = 7,0 Hz) ; 3,52 (s, 3H) ; 4,48 (d, 2H, J = 5,8 Hz) ; 4,88 (s, 2H) ; 6,07 (t, 1H, J = 5,8 Hz) ; 7,32 (d, 1H, J = 7,6 Hz) ; 7,49 (s, 1H) ; 7,59 (d, 1H, J = 7,6 Hz).

MS (ES⁺) *m/z* 708,1 [M+H]⁺, 730,1 [M+Na]⁺, 746,1 [M+K]⁺.

R_f (CH₂Cl₂/MeOH : 9/1) : 0,39.

4-(3-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(méthoxyméthoxy)propan-2-yl)-4-(tributylstannyl)benzylamino)-4-oxobutanoate de N-succinimidyle(30)



Le composé **28** (66 mg, 93 µmol) est dissous dans 2 mL d'acétonitrile anhydre sous azote et la N-hydroxysuccinimide (21,5 mg, 187 µmol) puis l'EDCI (36 mg, 187 µmol) sont ajoutés successivement et le milieu est agité 15 h à température ambiante. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu purifié sur silice (éluant CH₂Cl₂/AcOEt : 4/1) pour donner 45 mg d'une huile incolore (93 µmol, 60 % rdt).

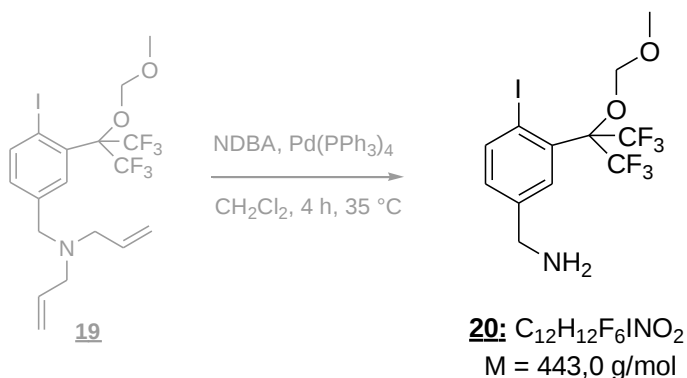
RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ 0,88 (t, 9H, J = 7,0 Hz) ; 1,07 (t, 6H, J = 8,3 Hz) ; 1,23-1,49 (m, 12H) ; 2,66 (t, 2H, J = 7,0 Hz) ; 2,73 (s, 4H) ; 3,03 (t, 2H, J = 7,0 Hz) ; 3,51 (s, 3H) ; 4,47 (d, 2H, J = 5,8 Hz) ; 4,87 (s, 2H) ; 6,02 (t, 1H, J = 5,8 Hz) ; 7,31 (d, 1H, J = 7,6 Hz) ; 7,48 (s, 1H) ; 7,58 (s, 1H, J = 7,6 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 12,9 ; 13,6 ; 27,4 ; 27,8 ; 29,0 ; 30,7 ; 43,3 ; 57,1 ; 84,1 ; 94,6 ; 121,2 (q, ¹J_{C-F} = 290 Hz) ; 121,9 ; 123,1 ; 128,3 ; 131,0 ; 134,8 ; 152,5 ; 172,1 ; 174,6 ; 175,2.

MS (ES⁺) m/z 827,2 [M+Na]⁺, 1629,2 [2M+Na]⁺.

Rf (CH₂Cl₂/AcOEt : 4/1) : 0,5.

(3-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(methoxymethoxy)propan-2-yl)-4-iodophenyl)methanamine
(20)



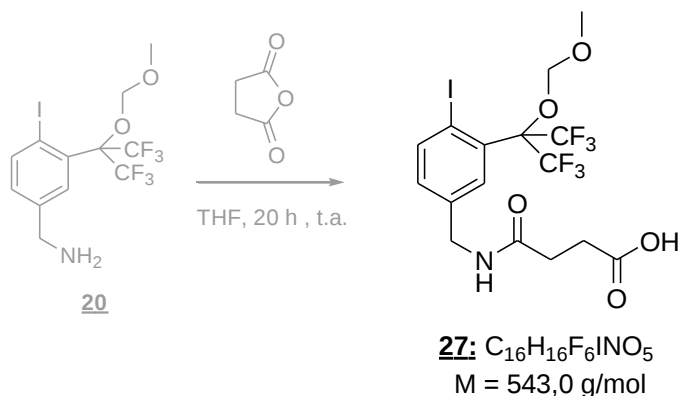
Le composé **19** (198 mg, 378 µmol) est dissous dans 2 mL de dichlorométhane est la solution est dégazée par bullage d'azote pendant 15 min. La solution est alors ajoutée à l'acide N,N-diméthylbarbiturique (355 mg, 2,27 mmol) et au Tétrakis(triphénylphosphine)palladium(0) (8,8 mg 7,6 µmol) préalablement placés sous azote dans un bicol surmonté d'un réfrigérant. Le milieu réactionnel est porté à 35 °C pendant 4 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu repris dans 10 mL d'éther diéthylique, lavé par 2 fois 5 mL de soude 1 M. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et concentrée sous vide. Le résidu obtenu est purifié sur silice (éluant : DCM/ MeOH : 95/5) pour donner 122 mg d'une huile légèrement jaune (378 µmol, 73 % rdt).

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ 1,54 (s, 2H) ; 3,56 (s, 3H) ; 3,88 (s, 2H) ; 5,02 (s, 2H) ; 7,09 (d, 1H, J = 8,2 Hz) ; 7,56 (s, 1H) ; 8,15 (d, 1H, J = 8,2 Hz).

MS (ES⁺) *m/z* 426,9 [M-NH₂]⁺ ; 444,0 [M+H]⁺.

Rf (CH₂Cl₂/MeOH : 9/1) : 0,19.

Acide 3-(3-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(méthoxyméthoxy)propan-2-yl)-4-iodobenzylcarbamoyl)propanoïque (27)



Le composé **20** (457 mg, 1,03 mmol) est dissous dans 10 mL de THF anhydre sous azote et l'anhydride succinique (258 mg, 2,58 mmol) est ajouté. Après 15 h d'agitation à température ambiante, le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu dissous dans le n-hexane. Le précipité blanc formé est éliminé par filtration et le filtrat évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur silice (éluant : CH₂Cl₂) pour donner 420 mg d'un solide blanc (773 μmol, 75 % rdt).

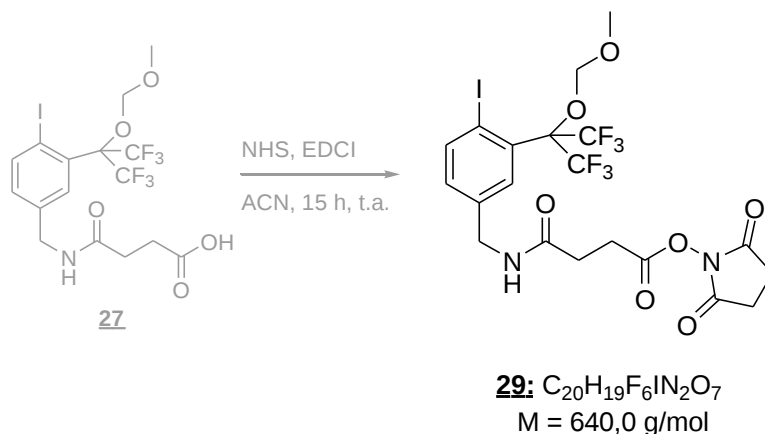
RMN ¹H (250 MHz, (CD₃)₂CO) δ 2,57 (m, 4H) ; 3,50 (s, 3H) ; 4,43 (s, 2H) ; 5,03 (s, 2H) ; 7,19 (d, 1H, 8,3 Hz) ; 7,56 (s, 1H) ; 7,79 (s, 1H) ; 8,19 (d, 1H, J = 8,3 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 25,5 ; 27,1 ; 30,9 ; 43,0 ; 57,1 ; 91,4 ; 95,0 ; 130,0 ; 130,8 ; 131,0 ; 138,7 ; 145,7 168,0 ; 169,0 ; 170,2.

MS (ES⁺) m/z 566,2 [M+Na]⁺.

Rf (CH₂Cl₂/AcOEt : 4/1) : 0,51.

3-(3-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(méthoxyméthoxy)propan-2-yl)-4-iodobenzylcarbamoyl)propanoate de N-succinimidyle (29)



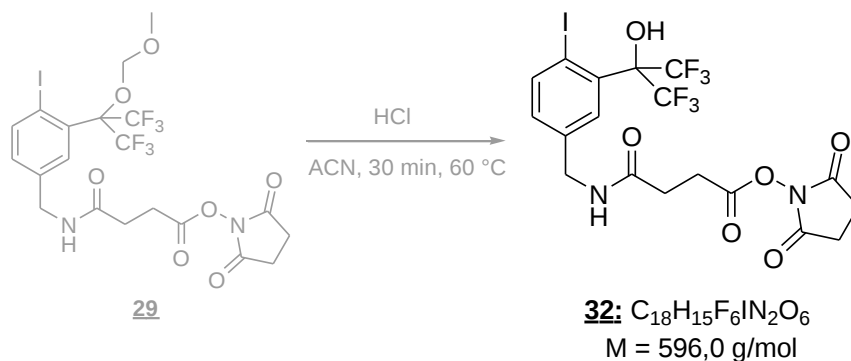
Le composé **27** (154 mg, 284 μmol) est dissous dans 5 mL d'acétonitrile anhydre sous azote et la N-hydroxysuccinimide (65 mg, 567 μmol) puis l'EDCI (109 mg, 567 μmol) sont ajoutés successivement et le milieu est agité 15 h à température ambiante. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu purifié sur silice (éluant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Acétone}$: 4/1) pour donner 97 mg d'un solide blanc (151 μmol , 53 % rdt).

RMN ^1H (250 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 2,66 (t, 2H, $J = 7,0 \text{ Hz}$) ; 2,93 (s, 4H) ; 2,95 (t, 2H, $J = 7,0 \text{ Hz}$) ; 3,50 (s, 3H) ; 4,44 (d, 2H, $J = 6,1 \text{ Hz}$) ; 5,04 (s, 2H) ; 7,18 (d, 1H, $J = 8,0 \text{ Hz}$) ; 7,56 (s, 1H) ; 7,86 (t, 1H, $J = 6,1 \text{ Hz}$) ; 8,20 (d, 1H, $J = 8,0 \text{ Hz}$).

MS (ES $^+$) m/z 663,0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$: 4/1) : 0,78.

3-(3-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-hydroxypropan-2-yl)-4-iodobenzylcarbamoyl)propanoate de N-succinimidyde (32)

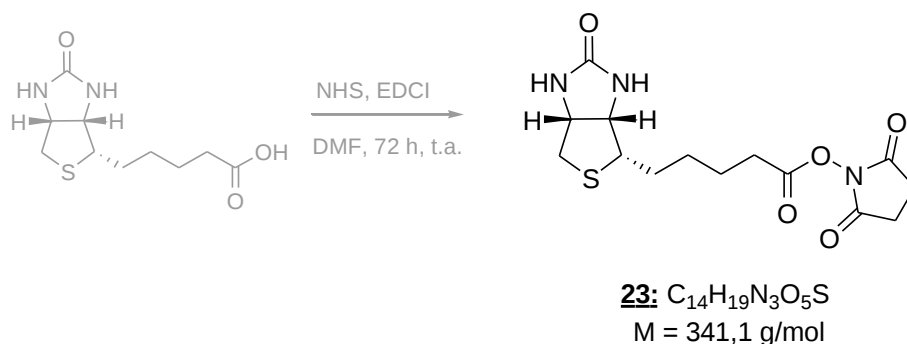


Le composé **32** (34 mg, 53 μmol) est dissous dans 2 mL d'acétonitrile et 20 μL d'HCl 37 % sont ajoutés. Le milieu est agité 30 min à 60 $^\circ\text{C}$. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu repris dans 5 mL d'AcOEt et lavé par 2 mL d'eau. Après séchage sur sulfate de sodium, la phase organique est concentrée sous vide et le résidu purifié sur silice (éluant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Acétone}$: 4/1) pour donner 32 mg d'un solide blanc (49 μmol , 92 % rdt).

RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ 2,62 (t, 2H, J = 7,0 Hz) ; 2,83 (s, 4H) ; 2,97 (t, 2H, J = 7,0 Hz) ; 4,40 (d, 2H, J = 5,8 Hz) ; 6,30 (t, 1H, J = 5,8 Hz) ; 7,02 (d, 2H, J = 8,0) ; 7,47 (s, 1H) ; 8,07 (d, 1H, J = 8,0 Hz).

MS (ES $^+$) m/z 596,9 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 618,9 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 634,9 $[\text{M}+\text{K}]^+$; 1214,8 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Acétone}$: 95/5) : 0,22.

Ester de N-succinimidyle de la L-biotine (23)

La L-biotine (300 mg, 1,23 mmol) est dissoute dans 10 mL de DMF anhydre sous azote et la N-hydroxysuccinimide (291 mg, 2,46 mmol) puis l'EDCI (471 mg, 2,46 mmol) sont ajoutés. Après 72 h d'agitation à température ambiante, le solvant est évaporé et repris dans du dichlorométhane. Le précipité formé est filtré et lavé avec du dichlorométhane refroidi dans un bain d'eau glacée pour donner 366 mg d'un solide blanc (1,07 mmol, 87 % rdt).

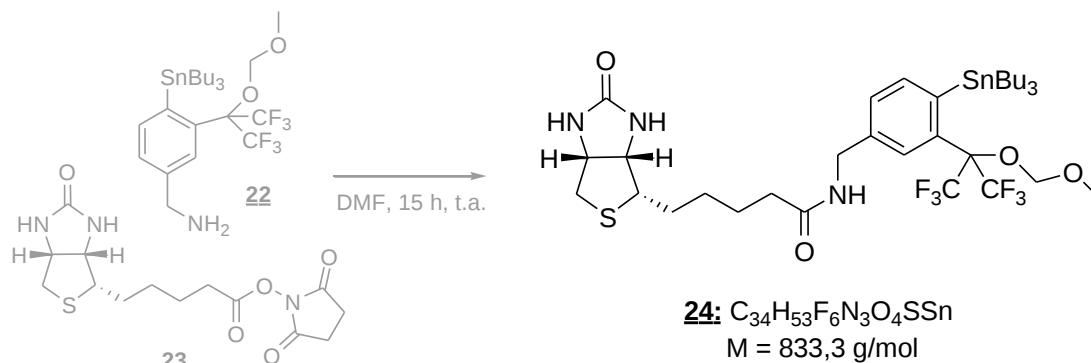
RMN ^1H (250 MHz, DMSO- d_6) δ 1,41-1,66 (m, 6H) ; 2,66 (t, 2H, $J = 7,0 \text{ Hz}$) ; 2,80 (s, 4H) ; 3,08 (m, 1H) ; 4,14 (m, 1H) ; 4,29 (m, 1H) ; 6,36 (s, 1H) ; 6,42 (s, 1H).

RMN ^{13}C (100 MHz, (DMSO- d_6) δ 24,5 ; 25,6 ; 27,7 ; 28,0 ; 30,2 ; 10,07 ; 55,4 ; 59,3 ; 61,1 ; 162,8 ; 169,1 ; 170,4.

MS (ES $^+$) m/z 342 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 364 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 705,2 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

T_f : 210 °C.

N-(3-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(méthoxyméthoxy)propan-2-yl)-4-(tributylstannyl)benzyl)biotinamide (24)



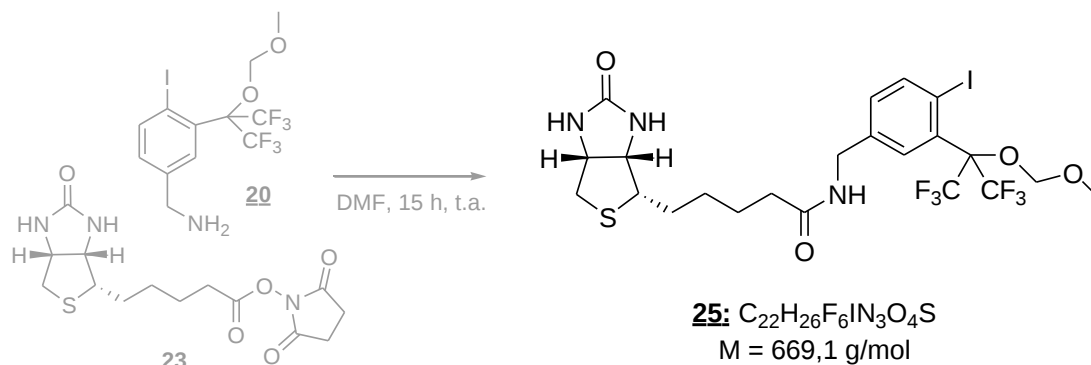
Le composé **22** (111 mg, 183 μmol) est dissous dans 2 mL de DMF anhydre sous azote, puis le composé **23** (66 mg, 192 μmol) est ajouté. Le milieu est agité 15 h à température ambiante, le solvant évaporé sous pression réduite et le résidu purifié sur silice (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 95/5) pour donner 97 mg d'une huile incolore (117 μmol , 64% rdt).

RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ 0,89 (t, 9H, $J = 7.0 \text{ Hz}$) ; 1,07 (t, 6H, $J = 8.3 \text{ Hz}$) ; 1.27-1.48 (m, 12H) ; 1.70 (m, 6H) ; 2.27 (t, 2H, $J = 7.3 \text{ Hz}$) ; 2.67 (d, 1H, $J = 12.5 \text{ Hz}$) ; 2.85-2.92 (m, 1H) ; 3.10-3.17 (m, 1H) ; 3.51 (s, 3H) ; 4.26-4.31 (m, 1H) ; 4.45-4.47 (m, 2H) ; 4,86 (s, 2H) ; 5.08 (s, 1H) ; 6.28-6.32 (m, 1H) ; 7.31 (d, 1H, $J = 7.6 \text{ Hz}$) ; 7.48 (s, 1H) ; 7.58 (d, 1H, $J = 7.6 \text{ Hz}$).

MS (ES⁺) m/z 1687.4 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 95/5) : 0,52.

N-(3-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(méthoxyméthoxy)propan-2-yl)-4-iodobenzyl)biotinamide
(25)

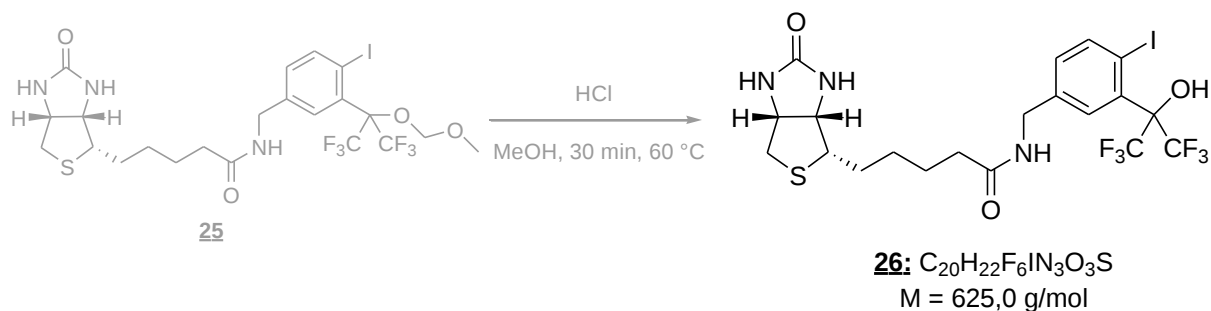


Le composé **20** (80 mg, 181 μmol) est dissous dans 2 mL de DMF anhydre sous azote, puis le composé **23** (65 mg, 190 μmol) est ajouté. Le milieu est agité 15 h à température ambiante, le solvant évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans 10 mL de dichlorométhane, lavé par 2 fois 5 mL d HCl 0,1 M et la phase organique séchée sur sulfate de sodium et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur silice (éluant : CH₂Cl₂/MeOH : 95/5) pour donner 92 mg d'une huile incolore (137 μmol , 76% rdt).

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ 1,38 (m, 2H) ; 1,64 (m, 4H) ; 2,22 (t, 2H, J = 7,3 Hz) ; 2,64 (m, 1H) ; 2,83 (m, 1H) ; 3,08 (m, 1H) ; 3,52 (s, 3H) ; 4,19 (m, 1H) ; 4,36 (d, 2H, J = 5,5 Hz) ; 4,42 (m, 1H) ; 4,97 (s, 2H) ; 5,63 (m, 1H) ; 6,71 (m, 1H) ; 7,00 (s, 1H) ; 7,02 (s, 1H) ; 7,45 (s, 1H) ; 8,10 (d, 1H, J = 8,2 Hz).

MS (ES⁺) m/z 670,1 [M+H]⁺ ; 692,0 [M+Na]⁺ ; 1339,0 [2M+H]⁺ ; 1361,0 [2M+Na]⁺.

Rf (CH₂Cl₂/MeOH : 95/5) : 0,44.

N-(3-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-hydroxypropan-2-yl)-4-iodobenzyl)biotinamide (27)

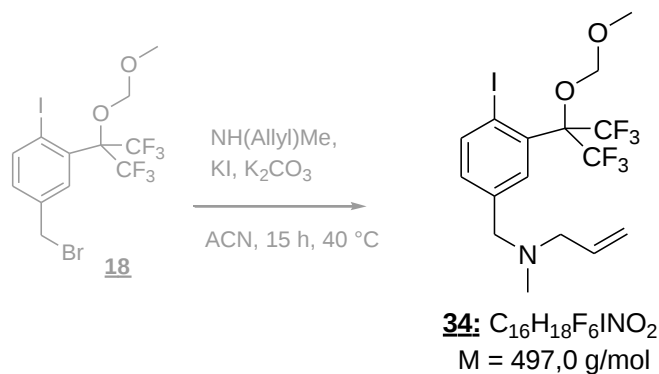
Le composé **26** (38 mg, 57 μ mol) est dissous dans 2 mL de méthanol et 20 μ L d'HCl 37 % sont ajoutés. Le milieu est agité 30 min à 60 °C. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu purifié sur silice (éluant CH₂Cl₂/MeOH : 95/5) pour donner 30 mg d'un solide blanc (48 μ mol, 85 % rdt).

RMN ¹H (250 MHz, CD₃OD) δ 1,38 (m, 2H) ; 1,47-1,75 (m, 4H) ; 2,21 (t, 2H, J = 7,3 Hz) ; 2,66 (m, 1H) ; 2,87 (m, 1H) ; 3,12 (m, 1H) ; 4,24 (m, 1H) ; 4,28 (s, 2H) ; 4,45 (m, 1H) ; 6,99 (d, 1H, J = 8,1 Hz) ; 7,45 (s, 1H) ; 8,09 (d, 1H, J = 8,1 Hz).

MS (ES⁺) *m/z* 626,0 [M+H]⁺ ; 648,0 [M+Na]⁺ ; 1250,9 [2M+H]⁺ ; 1273,8 [2M+Na]⁺.

R_f (CH₂Cl₂/MeOH : 95/5) : 0,27.

N-(3-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(méthoxyméthoxy)propan-2-yl)-4-iodobenzyl)-N-allylméthylamine (34)



Le composé **18** (500 mg, 986 μ mol) est dissous dans 5 mL d'acétonitrile anhydre sous azote. Le carbonate de potassium (273 mg, 1.97 mmol), l'iodure de potassium (164 mg, 986 μ mol) puis la N-allylméthylamine (188 μ L, 1.97 mmol) sont ajoutés et le milieu est porté 15 h à 40 °C. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu repris dans du dichlorométhane et les sels sont filtrés. Le solvant est évaporé et le résidu purifié sur silice (éluant : CHCl₃) pour donner 265 mg d'une huile incolore (490 μ mol, 54% rdt).

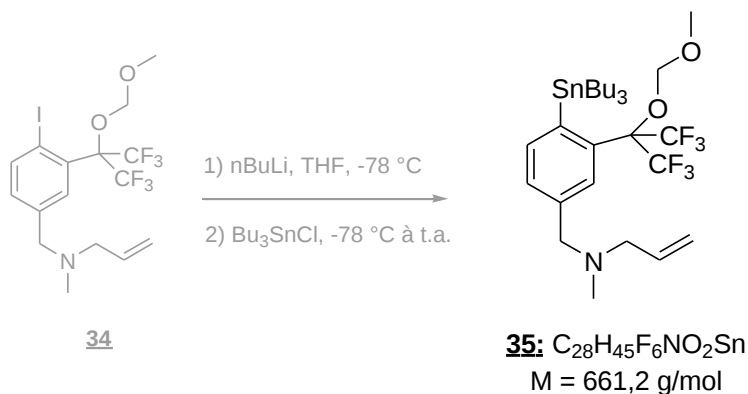
RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ 2.20 (s, 3H) ; 3.02 (d, 2H, J = 6.4 Hz) ; 3.50 (s, 2H) ; 3.57 (s, 3H) ; 5.03 (s, 2H) ; 5.15-5.24 (m, 2H) ; 5.79-5.24 (m, 1H) ; 7.09 (d, 1H, J = 8.0 Hz) ; 7.58 (s, 1H) ; 8.14 (d, 1H, J = 8.0 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 41,7 ; 57,1 ; 59,9 ; 60,2 ; 83,5 (sept, ²J_{C-F} = 28 Hz) ; 91,0 ; 95,0 ; 118,5 ; 122,6 (q, ¹J_{C-F} = 288 Hz) ; 129,6 ; 132,1 ; 132,2 ; 134,5 ; 138,7 ; 145,3.

MS (ES⁺) *m/z* 497.9 [M+H]⁺.

R_f (Heptane/Acétone : 9/1) : 0,37.

N-(3-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(methoxymethoxy)propan-2-yl)-4-(tributylstannyl)benzyl)-N-allylméthylamine (35)



Le composé **34** (470 mg, 945 µmol) est dissous dans 5 mL de THF anhydre sous azote et le milieu est refroidi à -78 °C par un bain acétone/carboglace et le n-butyllithium (886 µL, 1.42 mmol 1,6 M en hexanes) est ajouté goutte à goutte. Le milieu est agité 30 min à -78 °C puis le chlorure de tributylétain (462 mg, 1.42 mmol) en solution dans 2 mL de THF anhydre sous azote est ajouté. Le milieu est laissé remonter progressivement à t.a. sur la nuit. 5 mL d'une solution de chlorure d'ammonium 0,1 M sont ajoutés avec précaution et le milieu est extrait par 2 fois 5 mL de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, lavées par 5 mL d'une solution de fluorure de potassium saturée, séchées sur sulfate de sodium et concentrées sous vide. Le résidu est purifié sur silice (éluant : heptane/acétone : 98/2) pour donner 524 mg d'une huile légèrement jaune (794 µmol, 84 % rdt).

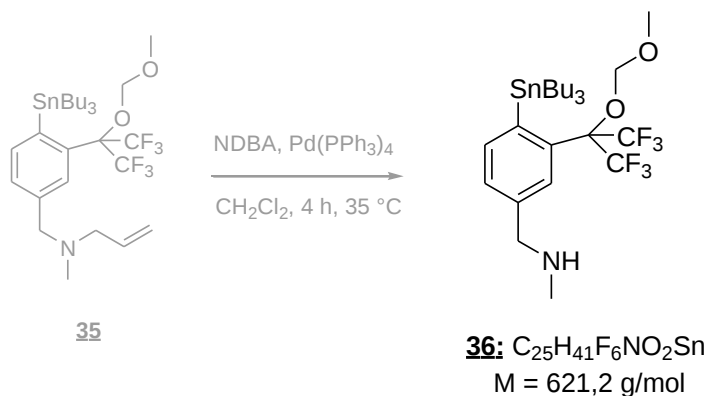
RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ 0.89 (t, 9H, J = 7.0 Hz) ; 1.08 (t, 6H, J = 8.3 Hz) ; 1.28-1.47 (m, 12H) ; 2.22 (s, 3H) ; 3.04 (d, 2H, 6.4 Hz) ; 3.52 (s, 3H) ; 3.54, (s, 2H) ; 4.89 (s, 2H) ; 5.16-5.25 (m, 2H) ; 5.83-5.97 (m, 1H) ; 7.38 (d, 1H, J = 7.0 Hz) ; 7.55-7.58 (m, 2H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 15,6 ; 15,9 ; 26,8 ; 27,8 ; 41,3 ; 57,1 ; 59,7 ; 60,6 ; 82,3 (sept, ²J_{C-F} = 29 Hz) ; 93,9 ; 118,4 ; 122,4 (q, ¹J_{C-F} = 289 Hz) ; 126,7 ; 127,5 ; 128,4 ; 129,0 ; 131,6 ; 135,7 ; 138,2 ; 139,1.

MS (ES⁺) m/z 662,3 [M+H]⁺.

Rf (Heptane/Acétone : 9/1) : 0,46.

(3-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(méthoxyméthoxy)propan-2-yl)-4-(tributyl-stannyl)phényl)-N-méthylméthanamine (36)



Le composé **35** (270 mg, 409 μmol) est dissous dans 5 mL de dichlorométhane est la solution est dégazé par bullage d'azote pendant 15 min. La solution est alors ajoutée à l'acide N,N-diméthylbarbiturique (191 mg, 1.23 mmol) et au tétrakis(triphénylphosphine)palladium(0) (19 mg 16.4 μmol) préalablement placés sous azote dans un bicol surmonté d'un réfrigérant. Le milieu réactionnel est porté à 35 °C pendant 4 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu repris dans 10 mL d'éther diéthylique, lavé par 2 fois 5 mL de carbonate de sodium 0,1 M. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et concentrée sous vide. Le résidu obtenu est purifié sur silice (éluant : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$: 95/5) pour donner 199 mg d'une huile légèrement jaune (321 μmol , 78 % rdt).

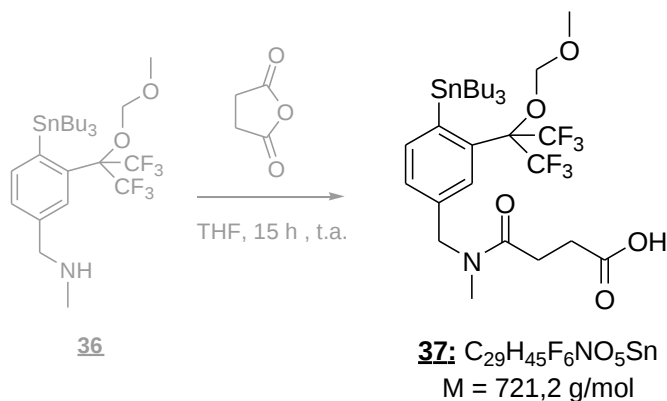
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 0.89 (t, 9H, $J = 7.0 \text{ Hz}$) ; 1.08 (t, 6H, $J = 8.3 \text{ Hz}$) ; 1.28-1.47 (m, 12H) ; 2.46 (s, 3 H) ; 3.52 (s, 3H) ; 3.78 (s, 2H) ; 4.88 (s, 2H) ; 7.38 (d, 1H, $J = 7.3 \text{ Hz}$) ; 7.55-7.59 (m, 2H).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 12.9 ; 13.6 ; 27.4 ; 29.0 ; 33.9 ; 54.0 ; 57.3 ; 83,1 (sept, $^2J_{\text{C-F}} = 29 \text{ Hz}$) ; 94.5 ; 122,4 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 288 \text{ Hz}$) ; 129.2, 129.4, 134.7, 139.0.

MS (ES $^+$) m/z 622.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 9/1) : 0,28.

Acide 4-((3-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(méthoxyméthoxy)propan-2-yl)-4-(tributylstannyl)benzyl)(méthyl)amino)-4-oxobutanoïque (37)



Le composé **36** (114 mg, 184 μ mol) est dissous dans 3 mL de THF anhydre sous azote et l'anhydride succinique (37 mg, 368 μ mol) est ajouté. Après 15 h d'agitation à température ambiante, le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu dissous dans le n-hexane. Le précipité blanc formé est éliminé par filtration et le filtrat évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur silice (éluant : CH₂Cl₂/MeOH : 95/5) pour donner 119 mg d'une huile incolore (165 μ mol, 90 % rdt).

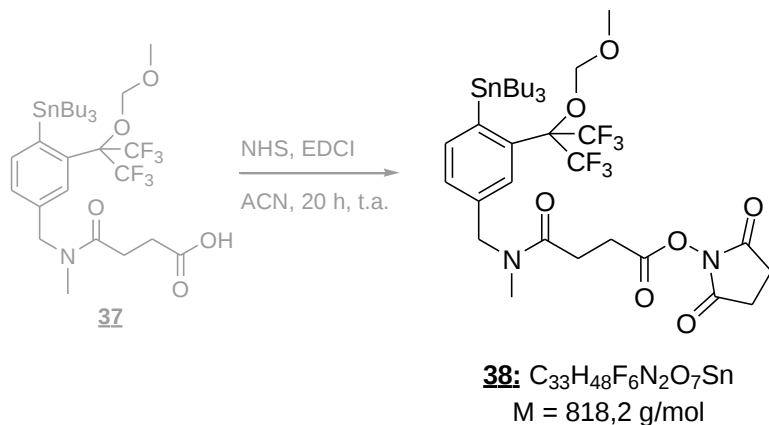
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) Deux conformères de l'amide avec un ratio 62/38 δ 0.89 (t, 9H, J = 7.2 Hz) ; 1.08 (t, 6H, J = 8.3 Hz) ; 1.30-1.47 (m, 12H) ; 2.68-2.77 (m, 4H), 2.97 (s, 1.86H) ; 2.98 (s, 1.14H) ; 3.51 (s, 1.86H) ; 3.52 (s, 1.14H) ; 4.58 (s, 0.76H) ; 4.62 (s, 1.24H) ; 4.89 (s, 1.24H) ; 4.92 (s, 0.76H) ; 7.21 (d, 0.38H, J = 7.6 Hz) ; 7.26 (d, 0.62H, J = 7.6 Hz) ; 7.39 (s, 0.38H) ; 7.43 (s, 0.62H) ; 7.58 (d, 0.62, J = 7.6 Hz) ; 7.64 (d, 0.38H, J = 7.6 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 12,8 ; 13,6 ; 27,7 ; 29,0 ; 28,2* ; 29,5* ; 34,9* ; 51,0* ; 57,2* ; 94,5* ; 122,7 (q, ¹J_{C-F} = 289 Hz) ; 126,7* ; 128,4* ; 134,6 ; 135,6* ; 136,4 ; 138,9* ; 144,2* ; 172,1* ; 176,8*. * Pics dédoublés.

MS (ES⁺) *m/z* 744.2 [M+Na]⁺ ; **(ES⁻)** *m/z* 719.8 [M-H]⁻.

R_f (CH₂Cl₂/MeOH : 9/1) : 0,54.

4-((3-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(méthoxyméthoxy)propan-2-yl)-4-(tributylstannyl)benzyl)(méthyl)amino)-4-oxobutanoate de N-succinimidyle (38)



Le composé **37** (170 mg, 236 µmol) est dissous dans 5 mL d'acétonitrile anhydre sous azote et la N-hydroxysuccinimide (54 mg, 472 µmol) puis l'EDCI (90 mg, 472 µmol) sont ajoutés successivement et le milieu est agité 20 h à température ambiante. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu purifié sur silice (éluant CH₂Cl₂/Acétone : 1/1) pour donner 155 mg d'une huile incolore (190 µmol, 80 % rdt).

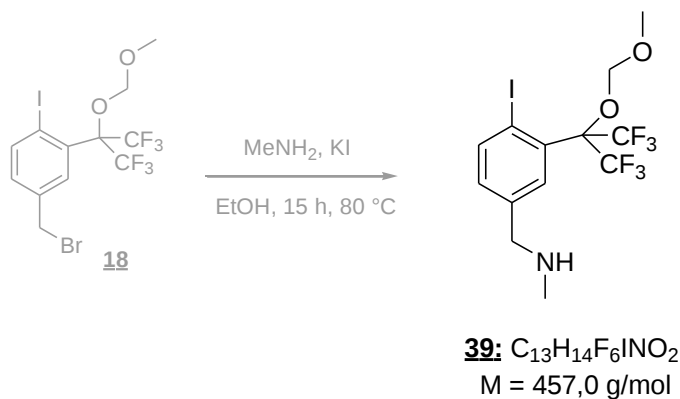
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) Deux conformères de l'amide avec un ratio 62/38 δ 0.89 (t, 9H, J = 7.2 Hz), 1.08 (t, 6H, J = 8.3 Hz), 1.31-1.45 (m, 12H), 2.79-2.85 (m, 7H), 2.94+2.97 (2s, 2,48+1.52H), 3.02-3.08 (m, 2H), 3.51+3.52 (2s, 1.86+1.14H), 4.56+4.62 (2s, 0.76+1.24H), 4.89+4.91 (2s, 1.24+0.76H), 7.20+7.25 (2d, 0.38+0.62H, J = 7.6 Hz), 7.39+7.42 (2d, 0.38+0.62H), 7.57+7.63 (2d, 0.62+0.38H, J = 7.6 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 12.8 ; 13.6 ; 25.6 ; 27.4 ; 28,1* ; 29.0, 34.7* ; 50.9 ; 57.2* ; 94.4 ; 126.7 ; 128.4* ; 136.5 ; 138.7 ; 142.4 ; 168.5 ; 169.0 ; 170.3. * Pics dédoublés.

MS (ES⁺) m/z 819.2 [M+H]⁺, 841.3 [M+Na]⁺, 857.3 [M+K]⁺, 1655.4 [2M+Na]⁺.

Rf (CH₂Cl₂/MeOH : 95/5) : 0,66.

(3-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(méthoxyméthoxy)propan-2-yl)-4-iodophényl)-N-méthylméthanamine (39)



Le composé **18** (304 mg, 600 μ mol) est dissous dans 5 mL d'éthanol absolu sous azote, puis l'iodure de sodium (90 mg, 600 μ mol) et la méthylamine (3 mL, 6 mmol, 2M en THF) sont introduits et le milieu est agité 15 h à 80 °C. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu repris dans du dichlorométhane et les sels filtrés. Le filtrat est évaporé et le résidu purifié sur silice (éluant : CH₂Cl₂/MeOH :95/5) pour donner 200 mg d'une huile jaune (437 μ mol, 73 % rdt).

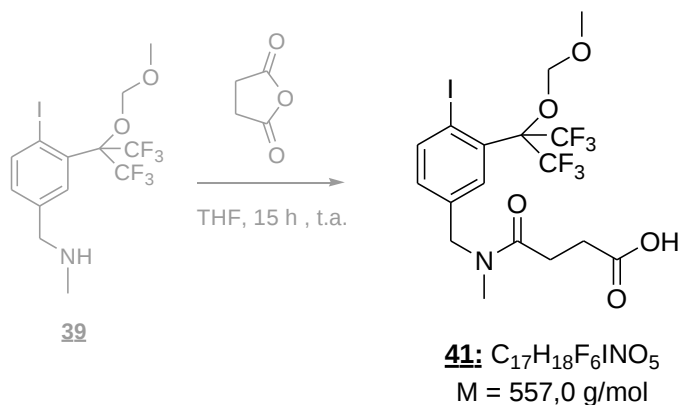
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2,57 (s, 3H) ; 3,56 (s, 3H) ; 4,11 (s, 2H) ; 5,02 (s, 2H) ; 7,24 (d, 1H, J = 8,0 Hz) ; 7,55 (s, 1H) ; 8,20 (d, 1H, J = 8,0 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 34,6 ; 54,1 ; 57,1 ; 83,4 (sept, ²J_{C-F} = 29 Hz) ; 91,6 ; 95,0 ; 122,6 (q, ¹J_{C-F} = 291 Hz) ; 129,9 ; 131,6 ; 131,8 ; 138,2 ; 145,6.

MS (ES⁺) *m/z* 458,3 [M+H]⁺.

Rf (CH₂Cl₂/MeOH : 9/1) : 0,23.

Acide 4-((3-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(méthoxyméthoxy)propan-2-yl)-4-iodobenzyl)(méthyl)amino)-4-oxobutanoïque(41)



Le composé **39** (127 mg, 278 μ mol) est dissous dans 3 mL de THF anhydre sous azote et l'anhydride succinique (30 mg, 300 μ mol) est ajouté. Après 15 h d'agitation à température ambiante, le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est purifié sur silice (éluant : CHCl₃/MeOH : 99/1) pour donner 143 mg d'un solide blanc (257 μ mol, 93 % rdt).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) Deux conformères de l'amide avec un ratio 72/28 δ 2,65-2,78 (m, 4H) ; 2,97+2,98 (2s, 0,84H+2,16H) ; 3,55+3,56 (2s, 2,16H+0,84H) ; 4,56+4,58 (2s, 0,56H+1,44H) ; 5,02+5,03 (2s, 1,44H+0,56H) ; 6,96+7,00 (2d, 0,28H+0,72H, J = 8,4 Hz) ; 7,38+7,72 (2s, 0,28H+0,72H) ; 8,15+8,21 (2d, 0,72H+0,28H, J = 8,4 Hz).

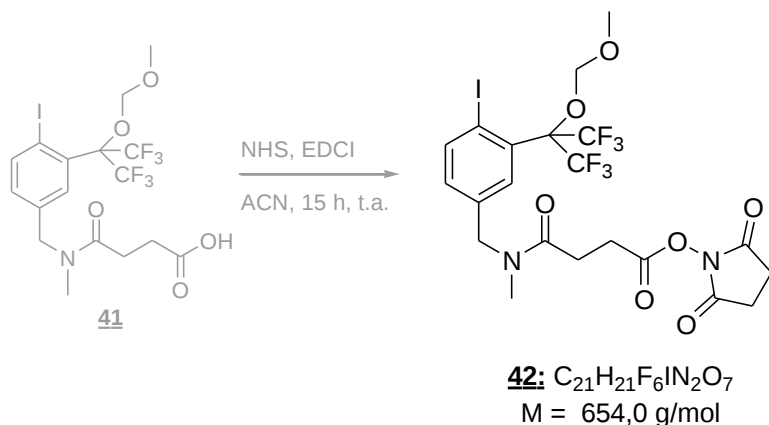
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 28,1* ; 29,3 ; 34,9* ; 50,7* ; 57,1, 84,0 ; 91,4* ; 95,0 ; 122,5 (q, ¹J_{C-F} = 289 Hz) ; 129,2 ; 129,9 ; 131,0 ; 137,5* ; 145,7* ; 172,1 ; 177,1*. * Pics dédoublés.

MS (ES⁺) m/z 579,9 [M+Na]⁺.

Rf (CHCl₃/MeOH : 95/5) : 0,27.

T_f : 138 °C.

4-((3-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(méthoxyméthoxy)propan-2-yl)-4-iodobenzyl)(méthyl)amino)-4-oxobutanoate de N-succinimidyle (42)



Le composé **41** (80 mg, 144 µmol) est dissous dans 2 mL d'acétonitrile anhydre sous azote et la N-hydroxysuccinimide (33 mg, 287 µmol) puis l'EDCI (55 mg, 287 µmol) sont ajoutés successivement et le milieu est agité 15 h à température ambiante. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu purifié sur silice (éluant CHCl₃/MeOH : 98/2) pour donner 91 mg d'une huile incolore (139 µmol, 97 % rdt).

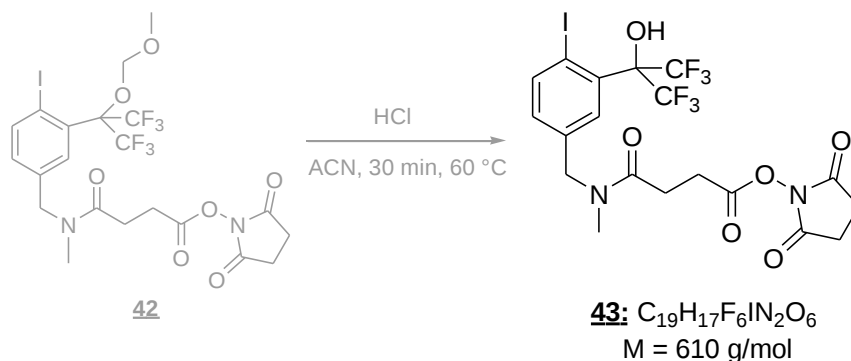
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) Deux conformères de l'amide avec un ratio 75/25 δ 2,82 (m, 4H) ; 2,95 (s, 3H) ; 3,55 (s, 3H) ; 4,43+4,58 (2s, 1,5H+0,5H) ; 5,01 (s, 2H) ; 6,93+7,02 (2d, 0,25+0,75H, J = 8,2 Hz) ; 7,38+7,40 (2s, 0,25+0,75H) ; 8,15+8,20 (2d, 0,75+0,25H, J = 8,2 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 25,5* ; 26,6 ; 28,0* ; 27,7* ; 50,6 ; 57,1 ; 91,4 ; 95,0 ; 128,8 ; 131,1* ; 136,8 ; 137,6 ; 145,7* ; 168,4 ; 169,0* ; 170,2. * Pics dédoublés.

MS (ES+) m/z 677,0 [M+Na]⁺.

Rf (CHCl₃/MeOH : 95/5) : 0,61.

4-((3-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-hydroxypropan-2-yl)-4-iodobenzyl)(méthyl)amino)-4-oxobutanoate de N-succinimidyle (43)



Le composé **42** (76 mg, 116 μmol) est dissous dans 1,5 mL d'acétonitrile et 5 μL d'HCl 37 % sont ajoutés. Le milieu est agité 5 h à 50 $^\circ\text{C}$. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu purifié sur silice (éluant $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$: 95/5) pour donner 68 mg d'une huile incolore (111 μmol , 96 % rdt).

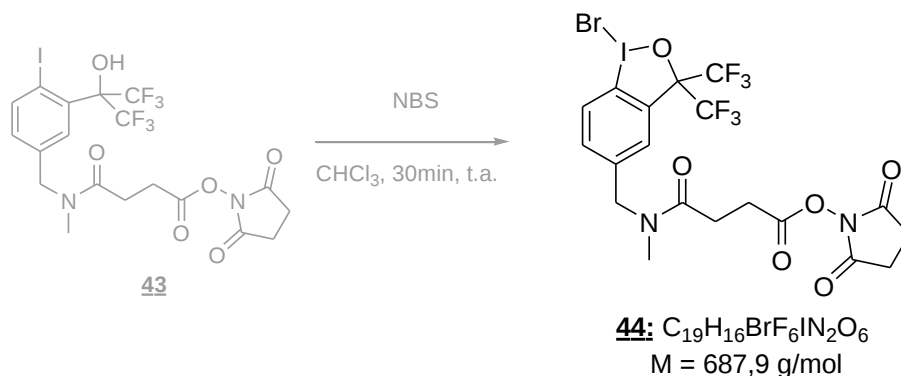
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) Deux conformères de l'amide avec un ratio 68/32 δ 2,78-2,86 (m, 8H) ; 2,83+2,94 (2s, 2,04H+0,98H) ; 3,01 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz) ; 4,57+4,55 (2s, 1,36H+0,64H) ; 6,96+6,98 (2d, 0,32H+0,68H, $J = 8,4$ Hz) ; 7,37+7,39 (2s, 0,32H+0,68H) ; 8,06+8,13 (2d, 0,68H+0,32H, $J = 8,4$ Hz).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 25,6 ; 26,6 ; 28,0* ; 34,7* ; 50,6* ; 78,7 ; 89,5 ; 122,6 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 289$ Hz) ; 127,8 ; 129,2 ; 121,0* ; 137,3* ; 145,2 ; 168,3 ; 169,0 ; 170,4. * Pics dédoublés.

MS (ES+) m/z 633,0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 9/1) : 0,66.

4-((1-Bromo-1,3-dihydro-5-methyl-3,3-bis(trifluoromethyl)-1,2-benziodoxole)(méthyl)amino)-4-oxobutanoate de N-succinimidyle (36)



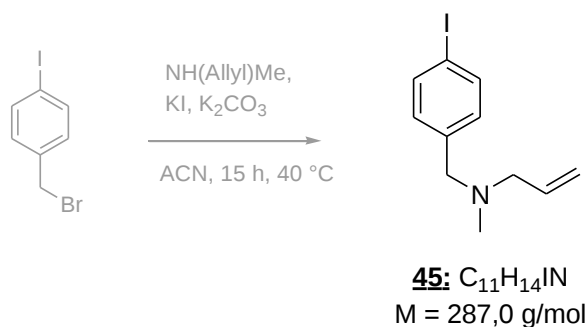
Le composé **35** (12 mg, 19,7 μmol) est dissous dans 1 mL de chloroforme et la N-bromosuccinimide (17 mg, 97,5 μmol) est ajoutée. Le milieu est agité 30 min à température ambiante et le solvant évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié sur silice (éluant : chloroforme) pour donner 9 mg d'une huile jaune (13,1 μmol , 67 % rdt).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) Deux conformères de l'amide avec un ratio 68/32 δ 2,75-2,86 (m, 6H) ; 2,82+2,93 (2s, 2,04H+0,96H) ; 3,05 (t, 2H, $J = 7,0 \text{ Hz}$) ; 4,57+4,54 (2s, 1,36H+0,64H) ; 7,45+7,50 (2s, 0,32H+0,68H) ; 7,63+7,73 (2d, 0,32H+0,68H, $J = 8,7 \text{ Hz}$) ; 7,95+8,04 (2d, 0,68H+0,32H, $J = 8,7 \text{ Hz}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 25,6 ; 26,6 ; 28,0* ; 34,7* ; 50,6* ; 78,7 ; 89,5 ; 108,0 ; 122,6 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 289 \text{ Hz}$) ; 127,6 ; 131,1* ; 137,4* ; 145,4 ; 168,2 ; 169,2 ; 170,1. * Pics dédoublés.

MS (ES+) m/z 711,0/713,0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Rf ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$: 95/5) : 0,65.

N-(4-iodobenzyl)-N-méthylallylamine (45)

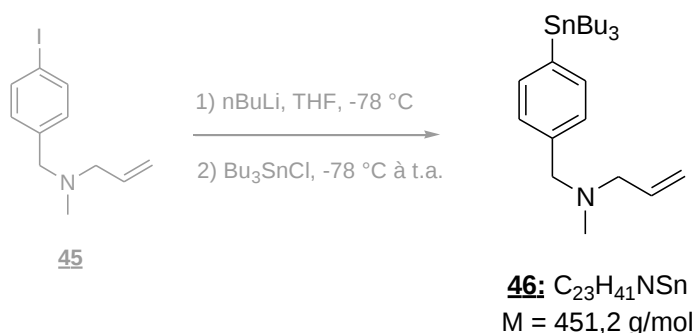
Le 1-(bromométhyl)-4-iodobenzène (1,835 g, 6,18 mmol) est dissous dans 20 mL d'acétonitrile anhydre sous azote puis le carbonate de potassium (1,708 g (12,36 mmol), l'iode de potassium (1,026 g, 6,18 mmol) et la N-allyl-N-méthylamine (1,175 mL, 12,36 mmol) sont ajoutés et le milieu porté à 40 °C pendant 15 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu repris dans du dichlorométhane. Les sels sont filtrés, le filtrat évaporé et le résidu purifié sur silice (éluant CH₂Cl₂/AcOEt : 9/1) pour donner 1,774 g d'un liquide incolore (5,93 mmol, 96 % rdt).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2,19 (s, 3H) ; 3,04 (d, 2H, J = 6,4 Hz) ; 3,45 (s, 2H) ; 5,16-5,24 (m, 2H) ; 5,85-5,95 (m, 1H) ; 7,09 (d, 2H, J = 8,0 Hz) ; 7,64 (d, 2H, J = 8,0 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 41,9 ; 60,3 ; 60,9 ; 92,3 ; 117,9 ; 131,0 ; 135,3 ; 137,3 ; 138,4.

MS (ES⁺) *m/z* 287,9 [M+H]⁺ ; 216,8 [M-N(Allyl)Me]⁺.

R_f (Heptane/Acétone : 9/1) : 0,31.

N-(4-tributylstannylbenzyl)-N-méthyl-N-allylamine (46)

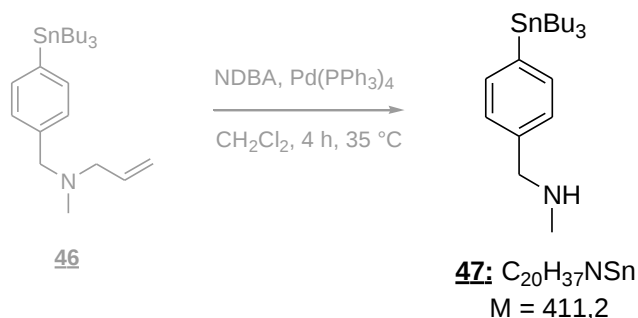
Le composé **45** (1,216 g, 4,23 μ mol) est dissous dans 20 mL de THF anhydre sous azote et le milieu est refroidi à -78 °C par un bain acétone/carboglance et le n-butyllithium (4 mL, 6,35 mmol 1,6 M en hexanes) est ajouté goutte à goutte. Le milieu est agité 30 min à -78 °C puis le chlorure de tributylétain (2,068 g, 6,35 mmol) en solution dans 2 mL de THF anhydre sous azote est ajouté. Le milieu est laissé remonter progressivement à t.a. sur la nuit. 10 mL d'une solution de chlorure d'ammonium 0,1 M sont ajoutés avec précaution et le milieu est extrait par 2 fois 20 mL de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, lavées par 10 mL d'une solution de fluorure de potassium saturée puis par 10 mL d'eau, séchées sur sulfate de sodium et concentrées sous vide. Le résidu est purifié sur silice (éluant : chloroforme) pour donner 1,826 g d'une huile incolore (4,06 mmol, 96 % rdt).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 0,87 (t, 9H, J = 7,2 Hz) ; 1,05 (t, 6H, J = 8,0 Hz) ; 1,23-1,39 (m, 6H) ; 1,50-1,60 (m, 6H) ; 2,23 (s, 3H) ; 3,08 (d, 2H, J = 6,4 Hz) ; 3,53 (s, 2H) ; 5,18-5,26 (m, 2H) ; 5,90-6,00 (m, 1H) ; 7,29 (d, 2H, J = 7,6 Hz) ; 7,42 (d, 2H, J = 7,6 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 9,6 ; 13,7 ; 27,4 ; 29,1 ; 41,9 ; 60,4 ; 61,5 ; 118,7 ; 128,4 ; 128,9 ; 135,3 ; 136,5 ; 140,6.

MS (ES⁺) *m/z* 452,1 [M+H]⁺ ; 381,1 [M-N(All)Me]⁺.

R_f (Heptane/Acétone : 9/1) : 0,39.

(4-(tributylstannyl)phényl)-N-méthylméthanamine (47)

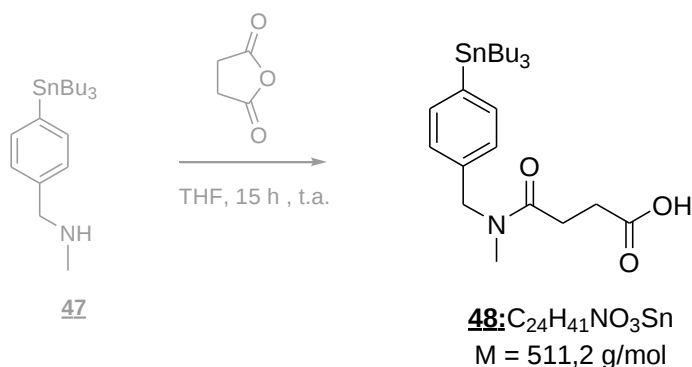
Le composé **46** (1,106 g, 2,46 mmol) est dissous dans 10 mL de dichlorométhane est la solution est dégazée par bullage d'azote pendant 15 min. La solution est alors ajoutée à l'acide N,N-diméthylbarbiturique (1,15 gg, 7,37 mmol) et au tétrakis(triphénylphosphine)palladium(0) (113 mg, 98 μmol) préalablement placés sous azote dans un bicol surmonté d'un réfrigérant. Le milieu réactionnel est porté à 35 °C pendant 4 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu repris dans 20 mL d'éther diéthylique, lavé par 2 fois 10 mL de carbonate de sodium 0,1 M. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et concentrée sous vide. Le résidu obtenu est purifié sur silice (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 9/1) pour donner 524 mg d'une huile incolore (1,28 mmol, 52 % rdt).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 0,89 (t, 9H, J = 7,2 Hz) ; 1,07 (t, 6H, J = 8,0 Hz) ; 1,32-1,38 (m, 6H) ; 1,49-1,57 (m, 6H) ; 2,47 (s, 3H) ; 3,78 (s, 2H) ; 7,32 (d, 2H, J = 7,6 Hz) ; 7,45 (d, 2H, J = 7,6 Hz).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 9,6 ; 13,7 ; 27,4 ; 29,2 ; 35,1 ; 55,3 ; 128,2 ; 136,7 ; 137,8 ; 141,2.

MS (ES+) m/z 412,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 9/1) : 0,29.

Acide 3-(N-(4-(tributylstannyl)benzyl)-N-méthylcarbamoyl)propanoïque (48)

Le composé **47** (185 mg, 451 μmol) est dissous dans 3 mL de THF anhydre sous azote et l'anhydride succinique (50 mg, 496 μmol) est ajouté. Après 15 h d'agitation à température ambiante, le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est purifié sur silice (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 97,5/2,5) pour donner 159 mg d'une huile incolore (312 μmol , 69 % rdt).

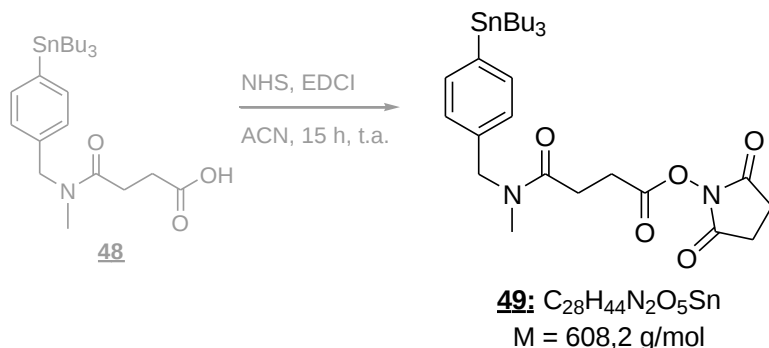
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) Deux conformères de l'amide avec un ratio 55/45 δ 0,88 (t, 9H, $J = 7,6 \text{ Hz}$) ; 1,02-1,07 (m, 6H) ; 1,29-1,37 (m, 6H) ; 1,50-1,57 (m, 6H) ; 2,72-2,75 (m, 4H) ; 2,96+2,98 (2s, 1,65H+1,35H) ; 4,54+4,59 (2s, 0,9H+1,1H) ; 7,12+7,17 (2d, 0,9H+1,1H, $J = 8,0 \text{ Hz}$) ; 7,42+7,46 (2d, 1,1H+0,9H, $J = 8,0 \text{ Hz}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 9,6 ; 13,6 ; 27,3 ; 29,1 ; 29,3 ; 31,7 ; 34,8 ; 51,2* ; 127,5* ; 136,3* ; 136,7* ; 141,6* ; 172,2* ; 175,7. * Pics dédoublés.

MS (ES+) m/z 534,3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 9/1) : 0,63.

3-(N-(4-(tributylstannyl)benzyl)-N-méthylcarbamoyl)propanoate de N-succinimidyle
(49)



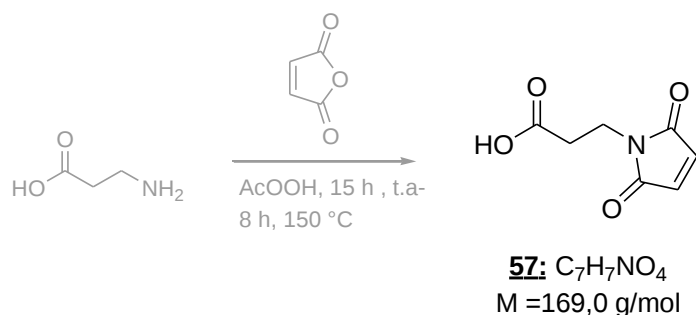
Le composé **48** (143 mg, 280 μmol) est dissous dans 5 mL d'acétonitrile anhydre sous azote et la N-hydroxysuccinimide (65 mg, 560 μmol) puis l'EDCI (107 mg, 560 μmol) sont ajoutés successivement et le milieu est agité 15 h à température ambiante. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu purifié sur silice (éluant $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$: 95/5) pour donner 155 mg d'une huile incolore (255 μmol , 91 % rdt).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) Deux conformères de l'amide avec un ratio 57/43 δ 0,89 (t, 9H, $J = 7,3 \text{ Hz}$) ; 1,02-1,08 (m, 6H) ; 1,28-1,387 (m, 6H) ; 1,50-1,57 (m, 6H) ; 2,76-2,85 (m, 8H) ; 2,94+2,98 (2s, 1,14H+0,86H) ; 4,52+4,59 (2s, 0,86H+1,14H) ; 7,12+7,19 (2d, 0,86H+1,14H, $J = 8,0 \text{ Hz}$) ; 7,41+7,45 (2d, 1,14H+0,86H, $J = 8,0 \text{ Hz}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 9,6 ; 13,6 ; 25,6 ; 26,7 ; 27,3 ; 28,2* ; 29,0 ; 34,6* ; 51,1* ; 125,8 ; 127,6 ; 136,7 ; 137,0 ; 141,0* ; 168,5 ; 168,9 ; 169,8*. *Pic dédoublé.

MS (ES+) m/z 509,9 $[\text{M-succinimidyle}]^+$.

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 9/1) : 0,74.

N-maléoyl-bêta-alanine (57)

La bêta-alanine (1,00 g, 11,22 mmol) est dissoute dans 40 mL d'acide acétique, l'anhydride maléique (1,101 g, 11,22 mmol) est ajouté et le milieu agité 15 h à température ambiante. Le milieu est alors blanc laiteux. Le milieu est agité 8 h à 150 °C et redevient limpide. L'acide acétique est évaporé sous pression réduite, le résidu repris dans du chloroforme et filtré. Le filtrat est évaporé et le résidu purifié sur silice (éluant : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$: 95/5) pour donner 1,31 g d'un solide blanc (7,74 mmol, 69 %).

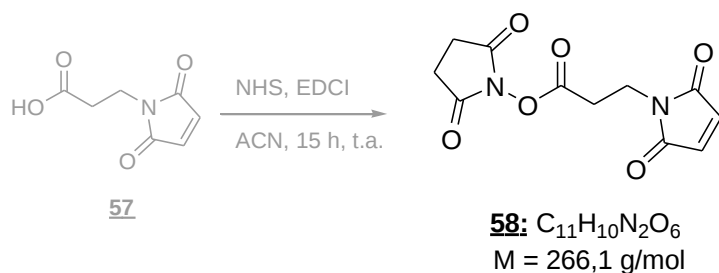
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 2,71 (t, 2H, $J = 7,2 \text{ Hz}$) ; 3,85 (t, 2H, $J = 7,2 \text{ Hz}$) ; 6,73 (s, 2H).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 32,5 ; 33,2 ; 134,2 ; 170,3 ; 176,3.

MS (ES-) m/z 167,6 $[\text{M-H}]^-$.

T_f : 102 °C

R_f ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$: 98/2) : 0,29.

3-(Maléimido)propanoate de N-hydroxysuccinimidyle (58)

Le composé **57** (256 mg, 1,51 mmol) est dissous dans 5 mL d'acétonitrile anhydre sous azote et la N-hydroxysuccinimide (348 mg, 3,03 μ mol) puis l'EDCI (580 mg, 3,03 μ mol) sont ajoutés successivement et le milieu est agité 15 h à température ambiante. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu purifié sur silice (éluant CHCl₃/MeOH : 99/1) pour donner 336 mg d'un solide blanc (1,26 mmol, 83 % rdt).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2,83 (s, 4H) ; 3,02 (t, 2H, J = 7,0 Hz) ; 3,94 (t, 2H, J = 7,0 Hz) ; 6,74 (s, 2H).

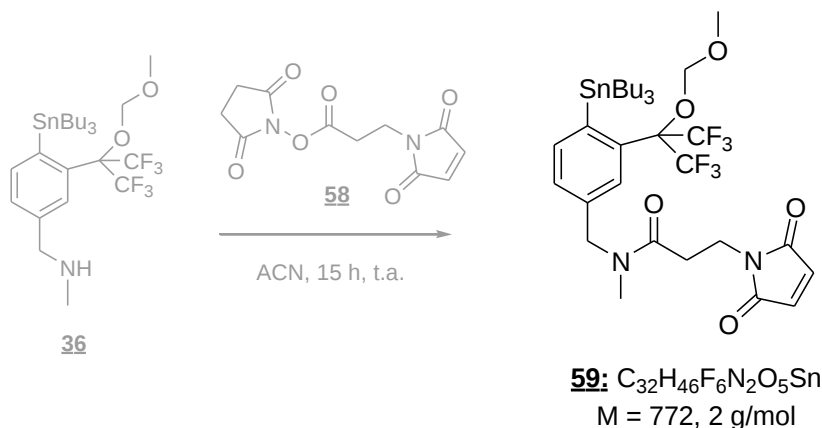
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 25,5 ; 29,7 ; 33,0 ; 134,3 ; 166,0 ; 168,7 ; 170,1.

MS (ES-) *m/z* 289,1 [M+Na]⁺ ; 265,0 [M-H]⁻.

T_f : 165 °C.

R_f (CHCl₃/MeOH : 98/2) : 0,60.

N-(4-(tributylstannyl)-3-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(méthoxyméthoxy)propan-2-yl)benzyl)-N-(3-Maléimidopropionyl)-N-méthylamide (59)



Le composé **36** (86 mg, 138 μ mol) est dissous dans 2 mL d'acétonitrile anhydre sous azote et le composé **58** (44 mg, 166 μ mol) est ajouté. Après 15 heure d'agitation à température ambiante, le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu purifié sur silice par du chloroforme pour donner 96 mg d'une huile incolore (124 μ mol, 90 %).

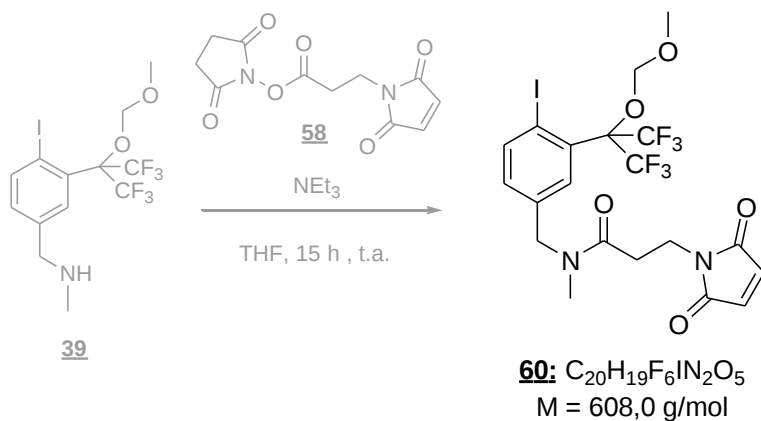
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) Deux conformères de l'amide avec un ratio 61/39 δ 0,89 (t, 9H, J = 7,2 Hz) ; 1,07-1,14 (m, 6H) ; 1,26-1,37 (m, 6H) ; 1,39-1,50 (m, 6H) ; 2,69-2,75 (m, 2H) ; 2,90+2,94 (2s, 1,83H+1,17H) ; 3,51 (s, 3H) ; 3,87-3,96 (m, 2H) ; 4,51+4,58 (2s, 0,78H+1,22H) ; 4,89+4,91 (2s, 1,22H+0,78H) ; 6,71 (s, 2H) ; 7,17+7,27 (m, 1H) ; 7,37+7,42 (2d, 0,39H+0,61H) ; 7,57+7,62 (2d, 0,61H+0,39H, J = 7,6 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 12,8 ; 13,6 ; 27,4 ; 29,0 ; 31,7* ; 34,1 ; 34,7 ; 50,5* ; 57,3 ; 84,2 ; 94,5 ; 122,7 (q, ¹J_{C-F} = 289 Hz) ; 126,8 ; 128,5 ; 134,2 ; 134,5 ; 136,6* ; 138,9* ; 169,9 ; 170,5*. * Pic découlé.

MS (ES⁺) *m/z* 773,4 [M+H]⁺ ; 795,4 [M+Na]⁺.

Rf (CHCl₃/MeOH : 99/1) : 0,53.

N-(4-iodo-3-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(méthoxyméthoxy)propan-2-yl)benzyl)-N-(3-Maléimidopropionyl)-N-méthylamide (60)



Le composé **39** (26 mg, 57 μ mol) est dissous dans 2 mL de DMF anhydre sous azote puis la triéthylamine (8 μ L, 57 μ mol) et le composé **58** (18 mg, 68 μ mol) sont ajoutés. Après 15 h d'agitation à température ambiante, le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu purifié sur silice (éluant : chloroforme) pour donner 30 mg d'une huile incolore (49 μ mol, 86 %).

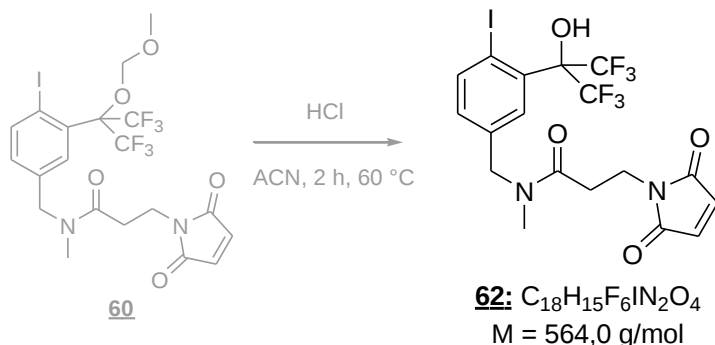
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) Deux conformères de l'amide avec un ratio 7/3 δ 2,57-2,72 (m, 2H) ; 2,82+2,92 (2s, 0,9H+2,1H) ; 3,38 (s, 3H) ; 3,61-3,79 (m, 2H) ; 4,54+4,62 (2s, 1,4H+0,6H) ; 7,01-7,15 (m, 3H) ; 7,29+7,39 (2s, 0,3H+0,7H) ; 8,24+8,29 (2d, 0,7H+0,3H, J = 8,0 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 31,2* ; 33,9* ; 34,8 ; 50,3* ; 57,1 ; 84,5 ; 91,4 ; 95,1 ; 122,6 (q, ¹J_{C-F} = 289 Hz) ; 129,1 ; 129,9 ; 131,1* ; 134,2 ; 137,6* ; 145,7* ; 170,1 ; 170,5. * Pic dédoublé.

MS (ES⁺) *m/z* 608,9 [M+H]⁺ ; 630,8 [M+Na]⁺.

R_f (CHCl₃/MeOH : 98/2) : 0,7.

N-(4-iodo-3-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-hydroxypropan-2-yl)benzyl)-N-(3-Maléimidopropionyl)-N-méthylamide (62)



Le composé **60** (48 mg, 79 μ mol) est dissous dans 1 ML de méthanol. 50 μ L d'HCl 37 % sont ajoutés et le milieu est porté 2 h à 60 °C. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu purifié sur silice (éluant : chloroforme) pour donner 44 mg d'un solide blanc (78 μ mol, 99 %).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) Deux conformères de l'amide avec un ratio 74/26 δ 2,66+2,73 (2t, 0,52H+1,48H, J = 7,6 Hz) ; 2,89+2,90 (2s, 0,78H+2,22H) ; 3,87-3,95 (m, 2H) ; 4,48+4,51 (2s, 0,52H+1,48H) ; 6,71 (s, 2H) ; 6,91+6,97 (2d, 0,26H+0,74H, J = 8,4 Hz) ; 7,35+7,39 (2s, 0,26H+0,74H) ; 8,06+8,13 (2d, 0,74H+0,26H, J = 8,4 Hz).

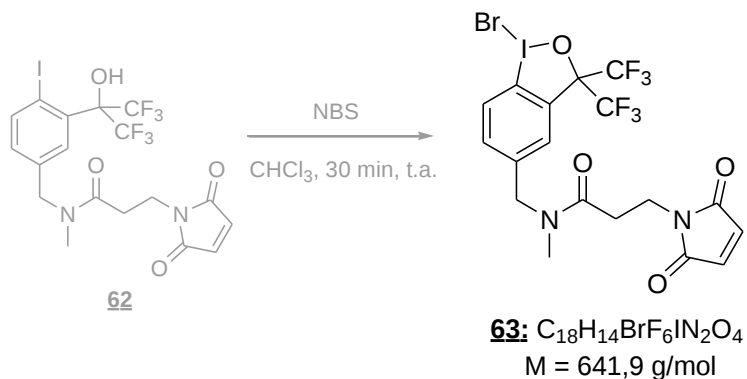
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 31,6* ; 33,9* ; 34,7 ; 50,2* ; 78,8 ; 89,4 ; 122,6 (q, ¹J_{C-F} = 289 Hz) ; 129,1 ; 129,3 ; 131,0 ; 134,2 ; 137,3* ; 145,1* ; 170,2 ; 170,5.

MS (ES⁺) *m/z* 587,0 [M+Na]⁺.

Tf : 140 °C.

Rf (CHCl₃/MeOH : 95/5) : 0,73.

N-((1-Bromo-1,3-dihydro-5-méthyl-3,3-bis(trifluorométhyl)-1,2-benziodoxole)-N-(3-Maléimidopropionyl)-N-méthylamide (63)



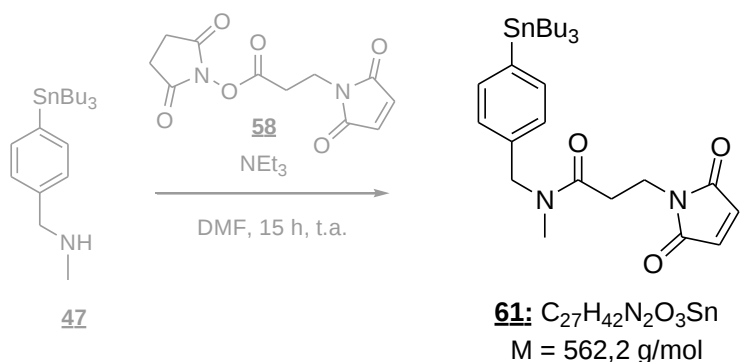
Le composé **62** (11 mg, 19,5 µmol) est dissous dans 1 mL de chloroforme et la N-bromosuccinimide (17 mg, 97,5 µmol) est ajoutée. Le milieu est agité 30 min à température ambiante et le solvant évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié sur silice (éluant : chloroforme) pour donner 9 mg d'une huile jaune (14,0 µmol, 72 % rdt).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) Deux conformères de l'amide avec un ratio 79/21 δ 2,70+2,75 (2t, 0,42H+1,58H, J = 7,6 Hz) ; 2,96+2,97 (2s, 0,63H+2,37H) ; 3,88+3,93 (m, 2H) ; 4,70+4,74 (2s, 0,42H+1,58H) ; 6,72 (s, 2H) ; 7,44+7,49 (2s, 0,21H+0,79H) ; 7,61+7,71 (2d, 0,21H+0,79H, J = 8,8 Hz) ; 7,98+8,07 (2d, 0,79H+0,21H, J = 8,8 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 31,2* ; 34,0* ; 35,0* ; 50,0* ; 84,1 ; 108,4 ; 122,7 (q, ¹J_{C-F} = 289 Hz) ; 128,9 ; 130,3* ; 132,8 ; 133,4* ; 134,2 ; 142,3 ; 170,3* ; 170,5. * Pic dédoublé.

MS (ES+) m/z 664,9/666,9 [M+Na]⁺.

Rf (CHCl₃/MeOH : 97/3) : 0,78.

N-(4-tributylstannylbenzyl)-N-(3-Maléimidopropionyl)-N-méthylamide (61)

Le composé **47** (168 mg, 393 μ mol) est dissous dans 5 mL de DMF anhydre sous azote et la triéthylamine (547 μ L, 3,93 mmol) et le composé **58** sont ajoutés. Le milieu est agité 15 h à température ambiante, le solvant évaporé sous pression réduite et le résidu purifié sur silice (éluant : $CHCl_3/MeOH$: 99/1) pour donner 170 mg d'une huile incolore (303 μ mol, 84 %).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) Deux conformères de l'amide avec un ratio 62/38 δ 0,86, t, 9H, J = 7,2 Hz) , 1,02-1,07 (m, 6H) ; 1,26-1,39 (m, 6H) ; 1,49-1,57 (m, 6H) ; 2,70-2,91 (m, 2H) ; 9,91+3,94 (2s, 1,86H+1,14H) ; 3,88+3,94 (m, 2H) ; 4,47+4,55 (2s, 1,24H+0,76H) ; 6,68+6,71 (2s, 0,76H+1,24H) ; 7,10+7,18 (2d, 0,76H+1,14H, J = 7,6 Hz) ; 7,41+7,45 (2d, 1,24H+0,76H).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 9,6 ; 13,7 ; 27,4 ; 29,1 ; 31,7* ; 34,2* ; 34,6* ; 50,7* ; 125,9 ; 127 ; 7 ; 134,2* ; 136,7* ; 137,0* ; 136,8* ; 170,6*.

MS (ES+) m/z 585,3 $[M+Na]^+$.

Rf ($CHCl_3/MeOH$: 99/1) : 0,64.

II. Radiomarquages des précurseurs

Isotopes radioactifs :

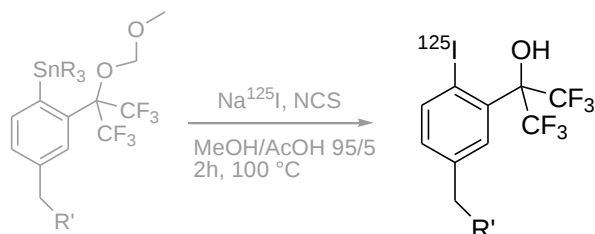
L'iode-125 sous forme d'iodure de sodium [^{125}I] NaI en solution dans la soude 0,048N est fourni par Perkin-Elmer avec une activité de 3,7 MBq/ μL à réception de la source. L'astate-211 est produit par irradiation de cibles de bismuth-209 au cyclotron du CEMHTI à Orléans et extrait selon les méthodes décrites précédemment.

Analyses chromatographiques :

Les chromatographies sur couche mince sont réalisées sur des plaques de silice 60 Å avec révélateur fluorescent à 254 nm sur support plastique. Après exposition sur des plaques Storage Phosphore Screen (Molecular dynamics), elles sont révélées sur un scanner typhoon 9410 (Amersham Bioscience). L'intensité relative des différentes espèces présentes est intégrée par le logiciel ImageQuant (Molecular dynamics) et les rendements de radiomarquage sont déterminés par intégration du spot de rapport frontal correspondant au rapport frontal de l'analogue non radioactif.

Les chromatographies liquides haute performance (HPLC) sont réalisées sur le même système que les références analytiques non radioactives. En sortie de cellule de détection UV, l'éluat est redirigé vers un détecteur de radioactivité à scintillation Flow Scintillation Analyser 150TR (Packard).

Radiomarquage des précurseurs stanniques à l'iode-125 dans le méthanol (composés 3a et 62a)



11: R = Me, R' = H

59: R = Bu, R' = N(CH₃)C(O)(CH₂)₂-maléimide

3a: R' = H

62a: R' = N(CH₃)C(O)(CH₂)₂-maléimide

100 μ L d'une solution de précurseur stannique à 2,5 nmol/ μ L dans le méthanol/acide acétique (95/5) sont introduits dans un flacon de 1 mL à bouchon vissable avec septum. 100 μ L d'une solution de NCS à 10 nmol/ μ L dans le méthanol/acide acétique 95/5 puis 1 μ L de [¹²⁵I]NaI (3,7 MBq) sont ajoutés. Le flacon est introduit dans un bloc chauffant réglé à 100 °C pendant 2 heures et un aliquot est prélevé pour analyse sur CCM et/ou HPLC.

Composé 3a : Rendement radiochimique : 95-98 %.

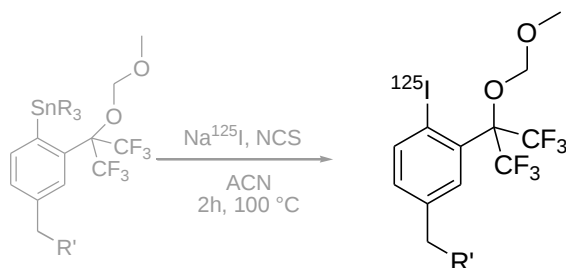
CCM (Heptane/acétone : 9/1) : R_f = 0,30.

HPLC : 16,47 min.

Composé 62a : Rendement radiochimique : 80-85 %.

CCM (CHCl₃/MeOH : 95/5) : R_f = 0,71.

Radiomarquage des précurseurs stanniques à l'iode-125 dans l'acétonitrile (composés 8a et 42a)



11: R = Me, R' = H

38: R = Bu, R' = N(CH₃)C(O)(CH₂)₂C(O)NHS

8a: R' = H

42a: R' = N(CH₃)C(O)(CH₂)₂C(O)NHS

100 μ L d'une solution de précurseur stannique à 2,5 nmol/ μ L dans l'acétonitrile sont introduits dans un flacon de 1 mL à bouchon vissable avec septum. 100 μ L d'une solution de NCS à 10 nmol/ μ L dans l'acétonitrile puis 1 μ L de [¹²⁵I]NaI (3,7 MBq) sont ajoutés. Le flacon est introduit dans un bloc chauffant réglé à 100 °C pendant 2 heures et un aliquot est prélevé pour analyse sur CCM et/ou HPLC.

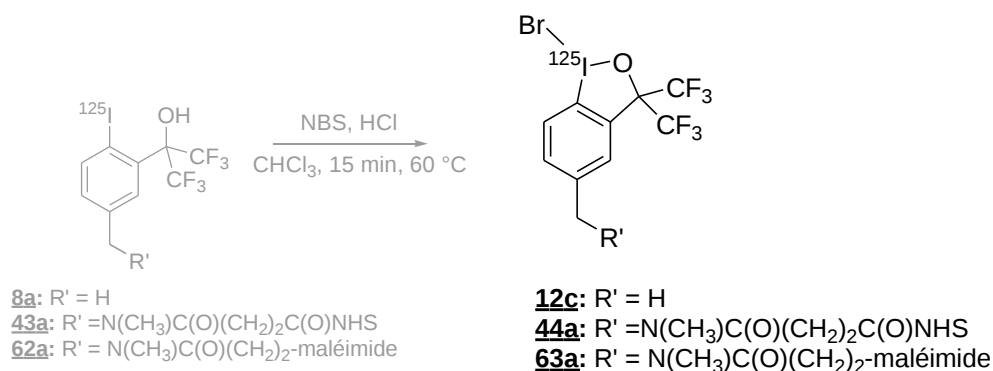
Composé 3a : Rendement radiochimique : 22 %.

CCM (Heptane/acétone : 9/1) : R_f = 0,75.

HPLC : 10,17 min.

Composé 43a : Rendement radiochimique : 10-15 %.

CCM (CHCl₃/MeOH : 95/5) : R_f = 0,54.

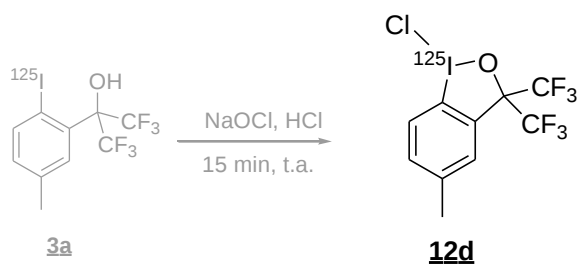
Formation des bromoiodanes (composés 12c, 44a et 63a)

A 50 μ L de solution de marquage contenant le composé **8a**, **43a** ou **62a** sont ajoutés 50 μ L d'une solution de NBS à 1,5 mg/ mL dans le chloroforme puis 1 μ L d'acide chlorhydrique 37 %. Le milieu est porté à 60 °C pendant 15 minutes. Un aliquot est alors prélevé pour analyse par CCM et/ou HPLC.

Composé 12c : Rendement radiochimique : 95-100 %.
 CCM (Heptane/acétone : 9/1) : R_f = 0,47.
 HPLC : 6,95 min.

Composé 44a : Rendement radiochimique : 90-95 %.
 CCM (CHCl₃/MeOH : 95/5) : R_f = 0,66.

Composé 63a : Rendement radiochimique : 90-95 %.
 CCM (CHCl₃/MeOH : 97/3) : R_f = 0,78.

Formation de chloroiodane 12d

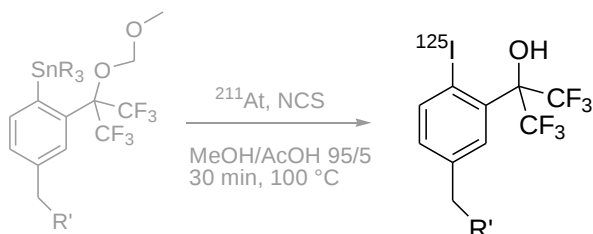
A 50 μL de solution de radiomarquage du composé **3a** en méthanol sont ajoutés 2 μL d'acide chlorhydrique 37 % puis 1 μL d'hypochlorite de sodium 10-15 %. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, un aliquot est prélevé pour analyses sur CCM et HPLC.

Composé 12c : Rendement radiochimique : 95-100 %.

CCM (Heptane/acétone : 9/1) : $R_f = 0,48$.

HPLC : 8,25 min.

Radiomarquage des précurseurs stanniques à l'astate-211 dans le méthanol (composés 3b et 63b)



11: R = Me, R' = H

59: R = Bu, R' = N(CH₃)C(O)(CH₂)₂-maléimide

3b: R' = H

62b: R' = N(CH₃)C(O)(CH₂)₂-maléimide

4 μ L d'une solution de précurseur stannique à 2,5 nmol/ μ L dans le méthanol/acide acétique (95/5) sont introduits dans un flacon de 1 mL à bouchon vissable avec septum. 3 μ L d'une solution de NCS à 10 nmol/ μ L dans le méthanol/acide acétique 95/5 puis 50 μ L d'astate-211 en solution dans le méthanol (4-8 MBq) sont ajoutés. Le flacon est introduit dans un bloc chauffant réglé à 100 °C pendant 30 minutes et un aliquot est prélevé pour analyse sur CCM et/ou HPLC.

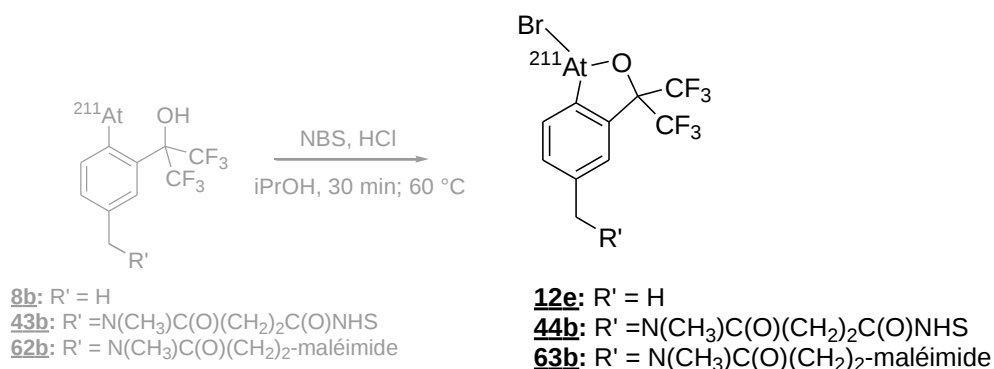
Composé 3a : Rendement radiochimique : 90-99 %.

CCM (Heptane/acétone : 3/2) : R_f = 0,66.

HPLC : 16,89 min.

Composé 62a : Rendement radiochimique : 95-99 %.

CCM (CHCl₃/MeOH : 95/5) : R_f = 0,70.

Formation des bromoastatanes (composés 12e, 44b et 63b)

A 50 µL de solution de marquage contenant le composé **8b**, **43b** ou **62b** sont ajoutés 50 µL d'une solution de NBS à 1,5 mg/ mL dans l'isopropanol puis 1 µL d'acide chlorhydrique 37 %. Le milieu est porté à 60 °C pendant 30 minutes. Un aliquot est alors prélevé pour analyse par CCM.

Composé 12c : Rendement radiochimique : 90-95 %.
CCM (Heptane/acétone : 3/2) : R_f = 0,75.

Composé 44a : Rendement radiochimique : 95-100 %.
CCM (CHCl₃/MeOH : 95/5) : R_f = 0,68.

Composé 63a : Rendement radiochimique : 95-100 %.
CCM (CHCl₃/MeOH : 97/3) : R_f = 0,76.

III. Couplage à la BSA des composés radiomarqués à l'astate-211 et stabilité sérique

Préparation de la BSA :

La réduction des ponts disulfures est effectuée par incubation pendant une heure à température ambiante de la BSA avec 20 équivalents de dithiothréitol dans du PBS. Après élution sur une colonne de perméation sur gel PD-10 (Amersham Bioscience) par du tampon carbonate 0,2 M pH 8, les fractions d'intérêt sont collectées. La BSA ainsi réduite est obtenue avec une concentration de 4 mg/mL.

Couplage du composé 62b (forme monovalente) :

A 50 µL de la solution de marquage sont ajoutés 5 µL de sulfite de sodium 1M. Le milieu est agité 5 minutes à température ambiante puis évaporé sous flux d'azote. 100 µL de solution de BSA réduite sont ajoutés et le milieu incubé 1 heure à 37 °C. Un aliquot déposé sur une ITLC-SG éluée dans l'acide trichloroacétique 10 %. Le rendement de couplage est de 96 %. La solution est éluée sur une colonne PD-10 par du PBS pour donner la BSA radiomarquée pure à plus de 99 % après analyse sur ITLC-SG.

Couplage du composé 63b (forme hypervalente) :

50 µL de la solution de marquage sont évaporés sous flux d'azote. 100 µL de solution de BSA réduite sont ajoutés et le milieu incubé 1 heure à 37 °C. Un aliquot déposé sur une ITLC-SG éluée dans l'acide trichloroacétique 10 %. Le rendement de couplage est de 81 %. La solution est éluée sur une colonne PD-10 par du PBS pour donner la BSA radiomarquée pure à plus de 99 % par analyse sur ITLC-SG.

Stabilités sériques :

150 µL de BSA couplée au composé **62b** ou **63b**, auxquels sont ajoutés 150 µL de sérum humain, sont incubés 12 heures à 4 °C, 20 °C ou 37 °C. L'activité totale de chaque milieu d'incubation est mesurée avant dépôt sur une colonne PD-10 et élution par du PBS. L'activité des fractions correspondant au volume de rétention est mesurée. Le pourcentage d'activité fixée à la BSA est donné par le rapport de l'activité collectée correspondant à la BSA sur l'activité déposée sur la colonne multipliée par 100.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Institut National du Cancer. La situation du cancer en France en 2009. Consulté le 28-08-2010 à <http://www.e-cancer.fr/component/docman/doc_download/3867-situation-du-cancer-en-france-2009>
2. Röntgen, W.C. A new kind of rays. *Science* **3**, 227-231 (1896).
3. Wilbur, D.S. Radiohalogenation of proteins: An overview of radionuclides, labeling methods and reagents for conjugate labeling. *Bioconjugate Chem.* **3**, 433-470 (1992).
4. Kostarelos, K. Rational design and engineering of delivery systems for therapeutics: biomedical exercises in colloid and surface science. *Adv. Colloid Interfac.* **106**, 147-168 (2003).
5. Harris, L.J. et al. The three-dimensional structure of an intact monoclonal antibody for canine lymphoma. *Nature* **360**, 369-372 (1992).
6. Kohler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-497 (1975).
7. Dearling, J. & Pedley, R. Technological Advances in Radioimmunotherapy. *Clin. Oncol.* **19**, 457-469 (2007).
8. Paganelli, G. et al. Pre-Targeted Locoregional Radioimmunotherapy with 90Y-biotin in Glioma Patients: Phase I Study and Preliminary Therapeutic Results. *Cancer Biother. Radiopharm.* **16**, 227-235 (2001).
9. Barbet, J. et al. Pretargeting with the Affinity Enhancement System for Radioimmunotherapy. *Cancer Biother. Radiopharm.* **14**, 153-166 (1999).
10. Goldenberg, D.M., Chatal, J., Barbet, J., Boerman, O. & Sharkey, R.M. Cancer Imaging and Therapy with Bispecific Antibody Pretargeting. *Update Cancer Ther.* **2**, 19-31 (2007).
11. Sharkey, R.M., Rossi, E.A., Chang, C. & Goldenberg, D.M. Improved Cancer Therapy and Molecular Imaging with Multivalent, Multispecific Antibodies. *Cancer Biother. Radiopharm.* **25**, 1-12 (2010).
12. Banerjee, S., Ambikalmajan Pillai, M.R. & Ramamoorthy, N. Evolution of Tc-99m in diagnostic radiopharmaceuticals. *Sem. Nucl. Chem.* **31**, 260-277 (2001).
13. Pinkas, L., Robins, P.D., Forstrom, L.A., Mahoney, D.W. & Mullan, B.P. Clinical experience with radiolabelled monoclonal antibodies in the detection of colorectal and ovarian carcinoma recurrence and review of the literature. *Nucl. Med. Commun.* **20**, 689-696 (1999).
14. Erb, D.A. & Nabi, H.A. Clinical and technical considerations for imaging colorectal cancers with technetium-99m-labeled antiCEA Fab' fragment. *J. Nucl. Med. Technol.* **28**, 12-18; quiz 21 (2000).
15. Ben-Haim, S. & Ell, P. 18F-FDG PET and PET/CT in the evaluation of cancer treatment response. *J. Nucl. Med.* **50**, 88-99 (2009).
16. Leskinen-Kallio, S. et al. Carbon-11-Methionine and PET Is an Effective Method To Image Head and Neck Cancer. *J. Nucl. Med.* **33**, 691-695 (1992).
17. Rinnab, L. et al. [(11)C]choline PET/CT in prostate cancer patients with biochemical recurrence after radical prostatectomy. *World J. Urol.* **27**, 619-625 (2009).
18. Dijkers, E.C. et al. Biodistribution of 89Zr-trastuzumab and PET Imaging of HER2-Positive Lesions in Patients With Metastatic Breast Cancer. *Clin Pharmacol Ther* **87**, 586-592 (2010).
19. Verel, I. et al. Long-Lived Positron Emitters Zirconium-89 and Iodine-124 for Scouting of Therapeutic Radioimmunoconjugates with PET. *cancer biother radiopharm* **18**, 655-661 (2003).
20. Schuhmacher, J. et al. Immunoscintigraphy with Positron Emission Tomography. *Cancer Research* **61**, 3712-3717 (2001).
21. Goldsmith, S.J. Radioimmunotherapy of Lymphoma: Bexxar and Zevalin. *Sem. Nucl.*

- Med.* **40**, 122-135 (2010).
22. Supiot, S. et al. Comparison of the biologic effects of MA5 and B-B4 monoclonal antibody labeled with iodine-131 and bismuth-213 on multiple myeloma. *Cancer* **94**, 1202-1209 (2002).
23. Allen, B.J., Tian, Z., Rizvi, S.M.A., Li, Y. & Ranson, M. Preclinical studies of targeted [alpha] therapy for breast cancer using ²¹³Bi-labelled-plasminogen activator inhibitor type 2. *Br. J. Cancer* **88**, 944-950 (2003).
24. Jurcic, J.G. et al. Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia. *Blood* **100**, 1233-1239 (2002).
25. Kennel, S.J. et al. Evaluation of ²²⁵Ac for Vascular Targeted Radioimmunotherapy of Lung Tumors. *cancer biother radiopharm* **15**, 235-244 (2000).
26. Su, F., Beaumier, P., Axworthy, D., Atcher, R. & Fritzberg, A. Pretargeted radioimmunotherapy in tumored mice using an in vivo ²¹²Pb/²¹²Bi generator. *Nucl. Med. Biol.* **32**, 741-747 (2005).
27. Meredith, R.F. et al. Initial Clinical Evaluation of Iodine-125-Labeled Chimeric 17-1A for Metastatic Colon Cancer. *J. Nucl. Med.* **36**, 2229-2233 (1995).
28. Corson, D., MacKenzie, K.R. & Segrè, E. Possible production of radioactive isotopes of element 85. *Phys. Rev.* **57**, 1087 (1940).
29. Hyde, E.K. The Present Status. of Elements 85 and 87. *J. Phys. Chem.* **58**, 21-26 (1954).
30. Palm, S., Humm, J.L., Rundqvist, R. & Jacobsson, L. Microdosimetry of astatine-211 single-cell irradiation: role of daughter polonium-211 diffusion. *Med. Phys.* **31**, 218-225 (2004).
31. Turkington, T.G. et al. Measuring astatine-211 distributions with SPECT. *Phys. Med. Biol.* **38**, 1121-1130 (1993).
32. Meyer, G.J. & Lambrecht, R.M. Excitation function for the ²⁰⁹Bi(7-Li,5n)²¹¹Rn nuclear reaction as a route to the ²¹¹Rn-²¹¹At generator. *J. Label. Compd. radiopharm.* **28**, 233 (1981).
33. Vinodkumar, A.M. et al. Fusion of Li9 with Pb208. *Phys. Rev. C* **80**, 054609 (2009).
34. Fellman, A., Ralston, L., Hickman, D., Ayres, L. & Cohen, N. Polonium Metabolism in Adult Female Baboons. *Radiat. Res.* **137**, 238-250 (1994).
35. Henriksen, G., Messelt, S., Olsen, E. & Larsen, R.H. Optimisation of cyclotron production parameters for the ²⁰⁹Bi(alpha, 2n) ²¹¹At reaction related to biomedical use of ²¹¹At. *Appl. Radiat. Isot.* **54**, 839-844 (2001).
36. Zalutsky, M.R., Zhao, X.G., Alston, K.L. & Bigner, D. High-level production of alpha-particle-emitting (²¹¹At) and preparation of (²¹¹At)-labeled antibodies for clinical use. *J. Nucl. Med.* **42**, 1508-1515 (2001).
37. Lindegren, S., Bäck, T. & Jensen, H.J. Dry-distillation of astatine-211 from irradiated bismuth targets: a time-saving procedure with high recovery yields. *Appl. Radiat. Isot.* **55**, 157-160 (2001).
38. Yordanov, A.T. et al. Wet harvesting of no-carrier-added ²¹¹At from an irradiated ²⁰⁹Bi target for radiopharmaceutical applications. *J. Rad. Nucl. Chem.* **262**, 593-599 (2004).
39. Bourgeois, M. Thèse : Étude de faisabilité de Radio-Immunothérapie α à l'astate-211. (2009).
40. Haddad, F. et al. ARRONAX, a high-energy and high-intensity cyclotron for nuclear medicine. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* **35**, 1377-1387 (2008).
41. Appelman, E.H. The Oxidation States of Astatine in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 805-807 (1961).
42. Johnson, G.L., Leininger, R.F. & Segre, E. Chemical Properties of Astatine. I. *J. Chem. Phys.* **17**, 1-10 (1949).

43. Visser, G.W. & Diemer, E.L. Inorganic astatine chemistry : formation of complex of astatine. *Radiochim. Acta* **33**, 145-151 (1983).
44. Champion, J. Thèse : Exploration du caractère métallique de l'astate en solution aqueuse. (2009).
45. Visser, G.W. Inorganic astatine chemistry part II : The chameleon behaviour and electrophilicity of At-species. *Radiochim. Acta* **47**, 97-103 (1989).
46. Pozzi, O.R. & Zalutsky, M.R. Radiopharmaceutical chemistry of targeted radiotherapeutics, Part 3: alpha-particle-induced radiolytic effects on the chemical behavior of (211)At. *J. Nucl. Med.* **48**, 1190-1196 (2007).
47. Pruszyński, M., Bilewicz, A., Wąs, B. & Petelenz, B. Formation and stability of astatide-mercury complexes. *J. Rad. Nucl. Chem.* **268**, 91-94 (2006).
48. , M., Bilewicz, A. & Zalutsky, M.R. Preparation of Rh[16aneS4-diol]211At and Ir[16aneS4-diol]211At Complexes as Potential Precursors for Astatine Radiopharmaceuticals. Part I: Synthesis. *Bioconjugate Chem.* **19**, 958-965 (2008).
49. Appelman, E.H. Solvent Extraction Studies of Interhalogen Compounds of Astatine. *J. Phys. Chem.* **65**, 325-331 (1961).
50. Fischer, S., Dreyer, R. & Albrecht, S. Pseudohalogen compounds of astatine: Synthesis and characterization of At/I/-tricyanomethanide-and At/I/-azide-compounds. *J. Rad. Nucl. Chem.* **117**, 275-283 (1987).
51. Dreyer, R., Dreyer, I., Fischer, S., Hartmann, H. & Rösch, F. Synthesis and characterization of cationic astatine compounds with sulphur-containing ligands stable in aqueous solutions. *J. Rad. Nucl. Chem.* **96**, 333-341 (1985).
52. Fischer, S., Dreyer, R., Hussein, H., Weber, M. & Hartmann, H. Synthesis and first characterization of cationic At/I/-compounds with selenium-containing neutral ligands. *J. Rad. Nucl. Chem.* **119**, 181-191 (1987).
53. Milesz, S., Jovchev, M., Schumann, D., Khalkin, V. & Milanov, M. The EDTA complexes of astatine. *J. Rad. Nucl. Chem.* **127**, 193-198 (1988).
54. Milesz, S., Norseev, Y., Szücs, Z. & Vasáros, L. Characterization of DTPA complexes and conjugated antibodies of astatine. *J. Rad. Nucl. Chem.* **137**, 365-372 (1989).
55. Schumann, D., Milesz, S., Jovchev, M., Chen So, B & Khalkin, V. Nitritotriacetate complex of univalent astatine. *Radiochim. Acta* **56**, 173-175 (1992).
56. Ning, L., Jiannan, J., Shangwu, M., Hengliu, C. & Yanping, Y. Preparation and preliminary evaluation of astatine-211 labeled IgG via DTPA anhydride. *J. Rad. Nucl. Chem.* **227**, 187-190 (1998).
57. Ludwig, R., Dreyer, R. & Fisher, S. First investigation of complex formation of At(I) with phosphorous organic compounds. *Radiochim. Acta* **47**, 129-130 (1989).
58. Ludwig, R., Fischer, S., Dreyer, R., Jacobi, R. & Beger, J. Complex formation equilibria between astatine(I) and sulphur-containing chelating ligands. *Polyhedron* **10**, 11-17 (1991).
59. Coenen, H., Moerlein, S. & Stöcklin, G. No-Carrier Added Radiohalogenation Methods with Heavy Halogens. *Radiochim. Acta* **34**, 47-68 (1983).
60. Liu, B.L. et al. Halogen exchanges using crown ethers: synthesis and preliminary biodistribution of 6-[211At]astatomethyl-19-norcholest-5(10)-en-3 beta-ol. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **36**, 561-563 (1985).
61. Brown, I., Carpenter, R.N., Link, E. & Mitchell, J.S. Potential diagnostic and therapeutic agents for malignant melanoma: Synthesis of heavy radiohalogenated derivatives of methylene blue by electrophilic and nucleophilic methods. *J. Radioanal. Nucl. Chem. Letters.* **107**, 337-351 (1986).
62. Meyer, G.J. et al. Synthesis and analysis of 2-[211At]-l-phenylalanine and 4-[211At]-l-phenylalanine and their uptake in human glioma cell cultures in-vitro. *Appl. Radiat. Isot.*

- 68, 1060-1065 (2010).
63. Meyer, G.J., Roessler, K. & Stoecklin, G. Reaction of aromatic diazonium salts with carrier-free radioiodine and astatine. Evidence for complex formation. *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 3121-3123 (1979).
64. Visser, G.W. The reaction of astatine with aromatic diazonium compounds. *Radiochem. Radioanal. Letters* **51**, 135 (1982).
65. Wunderlich, G., Fischer, S., Dreyer, R. & Franke, W.G. A simple method for labelling proteins with ²¹¹At via diazotized aromatic diamine. *J. Radioanal. Nucl. Chem. Letters.* **117**, 197-203 (1987).
66. Norseyev, Y., Nhan, D., Khalkin, V., Huan, N. & Vasaros, L. The preparation of astatine labelled tyrosine using an electrophilic reaction. *J. Rad. Nucl. Chem.* **94**, 185-190 (1985).
67. Norseev, Y. Synthesis of astatine-tagged methylene blue, a compound for fighting micrometastases and individual cells of melanoma. *J. Rad. Nucl. Chem.* **237**, 155-158 (1998).
68. Visser, G., Diemer, E. & Kaspersen, F. The preparation of aromatic astatine compounds through aromatic mercury compounds part II: Astatination of pyrimidines and steroids. *J. Labelled Compd Radiopharm.* **18**, 799-807 (1981).
69. Vaidyanathan, G. et al. A kit method for the high level synthesis of [²¹¹At]MABG. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 3430-3436 (2007).
70. Vaidyanathan, G., Affleck, D. & Zalutsky, M.R. Monoclonal antibody F(ab')₂ fragment labeled with N-succinimidyl 2,4-dimethoxy-3-halobenzoates: in vivo comparison of iodinated and astatinated fragments. *Nucl. Med. Biol* **21**, 105-110 (1994).
71. Garg, P.K., John, C.S. & Zalutsky, M.R. Preparation and preliminary evaluation of 4-[²¹¹At]astato-N-piperidinoethyl benzamide. *Nucl. Med. Biol.* **22**, 467-473 (1995).
72. Vaidyanathan, G., Larsen, R.H. & Zalutsky, M.R. 5-[²¹¹At]Astato-2'-deoxyuridine, an {alpha}-Particle-emitting Endoradiotherapeutic Agent Undergoing DNA Incorporation. *Cancer Res.* **56**, 1204-1209 (1996).
73. Narula, A.S. & Zalutsky, M. No-carrier added astatination of N-succinimidyl-3-(tri-n-butylstannyl) benzoate (ATE) via electrophilic destannylation. *Radiochim. Acta* **47**, 131-135 (1989).
74. Barth, R.F., Soloway, A.H. & Fairchild, R.G. Boron neutron capture therapy of cancer. *Cancer Res.* **50**, 1061-1070 (1990).
75. Valliant, J.F. et al. The medicinal chemistry of carboranes. *Coord. Chem. Rev.* **232**, 173-230 (2002).
76. Wilbur, D.S. et al. Reagents for astatination of biomolecules: comparison of the in vivo distribution and stability of some radioiodinated/astatinated benzamidyl and nido-carboranyl compounds. *Bioconjug. Chem.* **15**, 203-223 (2004).
77. Wilbur, D.S. et al. Reagents for astatination of biomolecules. 2. Conjugation of anionic boron cage pendant groups to a protein provides a method for direct labeling that is stable to in vivo deastatination. *Bioconjug. Chem.* **18**, 1226-1240 (2007).
78. Vaidyanathan, G., Friedman, H.S., Keir, S.T. & Zalutsky, M.R. Evaluation of meta-[²¹¹At]astatobenzylguanidine in an athymic mouse human neuroblastoma xenograft model. *Nucl. Med. Biol* **23**, 851-856 (1996).
79. Vaidyanathan, G. et al. Radioiodination and astatination of octreotide by conjugation labeling. *Nucl. Med. Biol.* **27**, 329-337 (2000).
80. Bloomer, W.D. et al. ²¹¹At radiocolloid therapy: further observations and comparison with radiocolloids of ³²P, ¹⁶⁵Dy, and ⁹⁰Y. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **10**, 341-348 (1984).
81. Kucka, J., Hrubý, M., Konák, C., Kozempel, J. & Lebeda, O. Astatination of

- nanoparticles containing silver as possible carriers of ^{211}At . *Appl. Radiat. Isot.* **64**, 201-206 (2006).
82. Hartman, K.B., Hamlin, D.K., Wilbur, D.S. & Wilson, L.J. $^{211}\text{AtCl@US}$ -tube nanocapsules: a new concept in radiotherapeutic-agent design. *Small* **3**, 1496-1499 (2007).
83. Aaij, C., Tschroots WRJM, Lindner, L. & Feltkamp, T.E. The preparation of astatine labelled proteins. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **26**, 25-30 (1975).
84. Vaughan, A.T. & Fremlin, J.H. The preparation of astatine labelled proteins using an electrophilic reaction. *Int. J. Nucl. Med. Biol.* **5**, 229-230 (1978).
85. Krohn, K.A. & Welch, M.J. Studies of radioiodinated fibrinogen--II. Lactoperoxidase iodination of fibrinogen and model compounds. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **25**, 315-323 (1974).
86. Visser, G.W., Diemer, E.L. & Kaspersen, F.M. The preparation and stability of astatotyrosine and astatiodotyrosine. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **30**, 749-752 (1979).
87. Visser, G.W., Diemer, E.L. & Kaspersen, F.M. The preparation and stability of ^{211}At -astato-imidazoles. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **31**, 275-278 (1980).
88. Visser, G.W.M., Diemer, E.L. & Kaspersen, F.M. The nature of the astatine-protein bond. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **32**, 905-912 (1981).
89. Zalutsky, M.R. & Narula, A.S. Astatination of proteins using an N-succinimidyl tri-n-butylstannyl benzoate intermediate. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. A* **39**, 227-232 (1988).
90. Lindegren, S. et al. High-efficiency astatination of antibodies using N-iodosuccinimide as the oxidising agent in labelling of N-succinimidyl 3-(trimethylstannyl)benzoate. *Nucl. Med. Biol.* **28**, 33-39 (2001).
91. Schwarz, U.P. et al. Preparation of ^{211}At -labeled humanized anti-Tac using ^{211}At produced in disposable internal and external bismuth targets. *Nucl. Med. Biol.* **25**, 89-93 (1998).
92. Bäck, T. et al. ^{211}At radioimmunotherapy of subcutaneous human ovarian cancer xenografts: evaluation of relative biologic effectiveness of an alpha-emitter in vivo. *J. Nucl. Med.* **46**, 2061-2067 (2005).
93. Garg, P.K., Harrison, C.L. & Zalutsky, M.R. Comparative tissue distribution in mice of the alpha-emitter ^{211}At and ^{131}I as labels of a monoclonal antibody and F(ab')₂ fragment. *Cancer Res.* **50**, 3514-3520 (1990).
94. Hadley, S.W., Wilbur, D.S., Gray, M.A. & Atcher, R.W. Astatine-211 labeling of an antimelanoma antibody and its Fab fragment using N-succinimidyl p-astatobenzoate: comparisons in vivo with the p-[^{125}I]iodobenzoyl conjugate. *Bioconjug. Chem.* **2**, 171-179 (1991).
95. Geissler, F., Anderson, S.K., Venkatesan, P. & Press, O. Intracellular Catabolism of Radiolabeled Anti- μ Antibodies by Malignant B-Cells. *Cancer Res.* **52**, 2907-2915 (1992).
96. Dohan, O. et al. The Sodium/Iodide Symporter (NIS): Characterization, Regulation, and Medical Significance. *Endocr. Rev.* **24**, 48-77 (2003).
97. Larsen, R.H., Slade, S. & Zalutsky, M.R. Blocking [^{211}At]astatide accumulation in normal tissues: preliminary evaluation of seven potential compounds. *Nucl. Med. Biol.* **25**, 351-357 (1998).
98. Garg, P.K., Alston, K.L. & Zalutsky, M.R. Catabolism of radioiodinated murine monoclonal antibody F(ab')₂ fragment labeled using N-succinimidyl 3-iodobenzoate and Iodogen methods. *Bioconjugate Chem.* **6**, 493-501 (1995).
99. Talanov, V.S. et al. Preparation and in vivo evaluation of a novel stabilized linker for ^{211}At labeling of protein. *Nucl. Med. Biol.* **33**, 469-480 (2006).
100. Yordanov, A.T. et al. Preparation and in vivo evaluation of linkers for ^{211}At labeling of

- humanized anti-Tac. *Nucl. Med. Biol.* **28**, 845-856 (2001).
101. Talanov, V.S. et al. Preparation and in vivo evaluation of novel linkers for ²¹¹At labeling of proteins. *Nucl. Med. Biol.* **31**, 1061-1071 (2004).
102. Claesson, A.K., Stenerlöw, B., Jacobsson, L. & Elmroth, K. Relative biological effectiveness of the alpha-particle emitter (²¹¹At) for double-strand break induction in human fibroblasts. *Radiat. Res.* **167**, 312-318 (2007).
103. Almqvist, Y. et al. In vitro characterization of ²¹¹At-labeled antibody A33--a potential therapeutic agent against metastatic colorectal carcinoma. *Cancer Biother. Radiopharm.* **20**, 514-523 (2005).
104. Andersson, H. et al. Comparison of the therapeutic efficacy of ²¹¹At- and ¹³¹I-labelled monoclonal antibody MOv18 in nude mice with intraperitoneal growth of human ovarian cancer. *Anticancer Res.* **21**, 409-412 (2001).
105. Palm, S. et al. Therapeutic Efficacy of Astatine-²¹¹-Labeled Trastuzumab on Radioresistant SKOV-3 Tumors in Nude Mice. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **69**, 572-579 (2007).
106. Zhang, M. et al. Effective therapy of murine models of human leukemia and lymphoma with radiolabeled anti-CD30 antibody, HeFi-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 8444-8448 (2007).
107. Zalutsky, M.R. et al. Clinical experience with alpha-particle emitting ²¹¹At: treatment of recurrent brain tumor patients with ²¹¹At-labeled chimeric antitenascin monoclonal antibody 81C6. *J. Nucl. Med.* **49**, 30-38 (2008).
108. Andersson, H. et al. Intraperitoneal {alpha}-Particle Radioimmunotherapy of Ovarian Cancer Patients: Pharmacokinetics and Dosimetry of ²¹¹At-MX35 F(ab')₂--A Phase I Study. *J. Nucl. Med.* **50**, 1153-1160 (2009).
109. Akiba, K. Chap. 1 : Hypervalent compounds. *Chemistry of hypervalent compounds (Ed. Wiley-VCH)* 1-8 (1999).
110. Lewis, G.N. The atom and the molecule. *J. Am. Chem. Soc.* **38**, 762-785 (1916).
111. Musher, J.I. The Chemistry of Hypervalent Molecules. *Angew. chem. Int. Ed. Engl.* **8**, 54-68 (1969).
112. Magnusson, E. Hypercoordinate molecules of second-row elements: d functions or d orbitals? *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 7940-7951 (1990).
113. Hach, R.J. & Rundle, R.E. The Structure of Tetramethylammonium Pentaiodide. *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 4321-4324 (1951).
114. Perkins, C.W. et al. An electrically neutral .sigma.-sulfuranyl radical from the homolysis of a perester with neighboring sulfenyl sulfur: 9-S-3 species. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 7753-7759 (1980).
115. Noury, S., Silvi, B. & Gillespie, R.J. Chemical Bonding in Hypervalent Molecules: Is the Octet Rule Relevant? *Inorg. Chem.* **41**, 2164-2172 (2002).
116. Gillespie, R.J. & Silvi, B. The octet rule and hypervalence: two misunderstood concepts. *Coord. Chem. Rev.* **233-234**, 53-62 (2002).
117. Akiba, K. Chap. 11 : Polycoordinate iodine compounds. *Chemistry of hypervalent compounds (Ed. Wiley-VCH)* 327-358 (1999).
118. Willgerodt, C. Ueber einige aromatische Jodidchloride. *J. Prakt. Chem.* **33**, 154-160 (1886).
119. Alcock, N.W., Countryman, R.M., Esperas, S. & Sawyer, J.F. Secondary bonding. Part 5. The crystal and molecular structures of phenyliodine(III) diacetate and bis(dichloroacetate). *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 854-860 (1979).
120. Stang, P.J. Alkynyl- and Alkenyl(phenyl)iodonium Compounds. New Synthetic Methods (86). *Angew. chem. Int. Ed. Engl.* **31**, 274-285 (1992).
121. Stang, P.J. & Zhdankin, V.V. Organic Polyvalent Iodine Compounds. *Chemical Reviews*

- 96, 1123-1178 (1996).
122. Yadav, J., Reddy, B., Basak, A. & Venkat Narsaiah, A. Recyclable 2nd generation ionic liquids as green solvents for the oxidation of alcohols with hypervalent iodine reagents. *Tetrahedron* **60**, 2131-2135 (2004).
123. Perozzi, E.F. et al. Directed dilithiation of hexafluorocumyl alcohol - formation of a reagent for the facile introduction of a stabilizing bidentate ligand in compounds of hypervalent sulfur (10-S-4), phosphorus (10-P-5), silicon (10-Si-5), and iodine (10-I-3). *J. Org. Chem.* **46**, 1049-1053 (1981).
124. Ochiai, M., Masaki, Y. & Shiro, M. Synthesis and structure of 1-alkynyl-1,2-benziodoxol-3(1H)-ones. *The Journal of Organic Chemistry* **56**, 5511-5513 (1991).
125. Amey, R.L. & Martin, J.C. Synthesis and reaction of substituted arylalkoxyiodinanes: formation of stable bromoarylalkoxy and aryldialkoxo heterocyclic derivatives of tricoordinate organoiodine(III). *J. Org. Chem.* **44**, 1779-1784 (1979).
126. Beesley, R.M., Ingold, C.K. & Thorpe, J.F. CXIX.-The formation and stability of spiro-compounds. Part I. spiro-Compounds from cyclohexane. *J. Chem. Soc., Trans.* **107**, 1080-1106 (1915).
127. Zhdankin, V. Benziiodoxole-Based Hypervalent Iodine Reagents in Organic Synthesis. *Curr. Org. Synth.* **2**, 121-145 (2005).
128. Nguyen, T.T., Wilson, S.R. & Martin, J.C. A stable aryldialkoxobrominane. Synthesis, structure, and reactions of an organo-nonmetallic 10-Br-3 species. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 3803-3811 (1986).
129. Kosugi, M., Shimizu, K., Ohtani, A. & Migita, T. Palladium Catalysed Reaction of Hexabutyliditin with Aryl Bromides: Preparation of Negatively Substituted Aryltributyltin. *Chem. Lett.* 829-830 (1981).doi:10.1246/cl.1981.829
130. Gosmini, C. & Périchon, J. New and simple one-step cobalt-catalyzed preparation of functionalized arylstannanes from the corresponding aryl bromides or iodides. *Org. Biomol. Chem.* **3**, 216 (2005).
131. Vutukuri, D.R. et al. A Mild Deprotection Strategy for Allyl-Protecting Groups and Its Implications in Sequence Specific Dendrimer Synthesis. *J. Org. Chem.* **68**, 1146-1149 (2003).
132. Braish, T.F. & Fuchs, P.L. KH/18-Crown-6: A Powerful Base for the Protection of Hindered Alcohols with t-Butyldimethylsilylchloride. *Synthetic commun.* **16**, 111-115 (1986).
133. Stork, G. & Takahashi, T. Chiral synthesis of prostaglandins (PGE₁) from D-glyceraldehyde. *Journal of the American Chemical Society* **99**, 1275-1276 (1977).
134. Rondot, C. Méthodologie de synthèse diastéréosélectives d'ortho-1,2-diaminoalkylphénols, vers la synthèse totale des bioxalomycines - Réaction tandem de N-arylation/Heck compétitive. (2005).
135. Braddock, D.C., Cansell, G., Hermitage, S.A. & White, A.J.P. Bromoiodinanes with an I(III)-Br bond: preparation, X-ray crystallography and reactivity as electrophilic brominating agents. *Chem. Commun.* 1442-1444 (2006).
136. Wilbur, D.S. et al. Development of a Stable Radioiodinating Reagent to Label Monoclonal Antibodies for Radiotherapy of Cancer. *J. Nucl. Med.* **30**, 216-226 (1989).
137. Pozzi, O.R. & Zalutsky, M.R. Radiopharmaceutical chemistry of targeted radiotherapeutics, part 1: effects of solvent on the degradation of radiohalogenation precursors by ²¹¹At alpha-particles. *J. Nucl. Med.* **46**, 700-706 (2005).
138. Alliot, C., Cherel, M., Barbet, J., Sauvage, T. & Montavon, G. Extraction of astatine-211 in diisopropylether (DIPE). *Radiochim. Acta* **97**, 161-165 (2009).
139. Garro-Helion, F., Merzouk, A. & Guibe, F. Mild and selective palladium(0)-catalyzed deallylation of allylic amines. Allylamine and diallylamine as very convenient ammonia

- equivalents for the synthesis of primary amines. *J. Org. Chem.* **58**, 6109-6113 (1993).
140. Tsuji, J., Takahashi, H. & Morikawa, M. Organic syntheses by means of noble metal compounds XVII. Reaction of [pi]-allylpalladium chloride with nucleophiles. *Tetrahedron Letters* **6**, 4387-4388 (1965).
 141. Bourgeois, M. et al. Feasibility of the radioastatination of a monoclonal antibody with astatine-211 purified by wet extraction. *J. Labelled Compd Radiopharm.* **51**, 379-383 (2008).
 142. Faivre-Chauvet, A. et al. Pre-clinical and clinical studies of two new bifunctional chelating agents for immunoscintigraphy with ¹¹¹In-anti-CEA monoclonal antibody. *Nucl. Med. Commun.* **17**, 781-789 (1996).
 143. Nguyen, T.T. & Martin, J.C. A dialkoxyarylbrominane. The first example of an organic 10-Br-3 species. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 7382-7383 (1980).

LISTE DES SYMBOLES ET ABBREVIATIONS

ACE	Antigène Carcino-Embryonnaire
Ach	Anticorps Chimérique
ACN	Acétonitrile
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AES	Affinity Enhancement System
APTS	Acide paratoluènesulfonique
ARRONAX	Accélérateur pour la Recherche en Radiochimie et Oncologie à Nantes Atlantique
BCA	Bifunctionnal Chelating Agent
Bn	Benzyl
Bq	Becquerel
BSA	Bovin Serum Albumin
CCM	Chromatographie sur couche mince
CE	Capture Electronique
CEMHTI	Conditions Extrêmes et Matériaux : Haute Température et Irradiation
CI	Conversion Interne
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
cpm	Coups par minute
DCM	Dichlorométhane
DIPE	Ether diisopropylique
DIPEA	N,N-diisopropyléthylamine
DMF	N,N-diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOTA	Acide 1,4,7,10-Tétraazacyclododecane-1,4,7,10-tétraacétique
EDCI	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride

EDTA	acide éthylènediamine tétraacétique
eV	électronVolt
FDG	[18F]-fluoro-déoxy-glucose
GP	Groupeement Protecteur
HSAB	Hard and Soft Acids and Basis
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectroscopy
IgG	Immunoglobulines G
IRM	Imagerie par Résonnance Magnétique
ITLC-SG	Instant Thin Layer Chromatography-Silica Gel
Ka	Constant d'affinité
kDa	Kilodalton
mAb	Anticorps Monoclonal
mb	millibarn
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
MOM	Méthoxyméthyle
NBS	N-bromosuccinimide
NCS	N-Chlorosuccinimide
NDBA	Acide N,N-diméthylbarbiturique
NHS	N-hydroxysuccinimide
NTA	Acide nitrilotriacétique
Nu	Nucléophile
Ox	Oxydant
PBS	Tampon Phosphate Salin
PEEK	Polyetheretherketone

pH	Potentiel Hydrogène
ppm	partie par million
Rdt	Rendement
Rf	Rapport frontal
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SAB	Succinimidyle astatobenzoate
SPECT	Single Emission Computed Tomography
t.a.	Température ambiante
TBDMS	tert-butyldiméthylsilyle
TEL	Transfert d'Energie Linéique
TEP	Tomographie par Emission de Positons
THF	Tétrahydrofurane
TMS	Triméthylsilyle
UV	Ultra-violet

NOUVELLE METHODE DE RADIOMARQUAGE DES ANTICORPS A L'ASTATE-211 HYPERVALENT POUR LA RADIOIMMUNOTHERAPIE ALPHA DES CANCERS

L'astate-211 est un radionucléide émetteur de particules alpha très prometteur pour la thérapie des cancers. Associé à un vecteur immunologique adapté, il pourrait permettre le traitement de différents types de micrométastases ou de cancers résiduels. Cependant, le manque de stabilité des méthodes de radiomarquage des anticorps avec ce radionucléide est un frein au développement d'applications cliniques.

Ces travaux ont eu pour but la mise au point d'une nouvelle méthode de radiomarquage des anticorps à l'astate-211. La spécificité de cette méthode est d'utiliser pour la première fois l'astate-211 sous forme hypervalente. Des précurseurs stanniques ont été conçus pour permettre l'introduction de l'astate-211 sous une forme trivalente stabilisée. L'étude de faisabilité du radiomarquage des anticorps par cette méthode ainsi que les tests de stabilité préliminaires ont également été réalisés.

Mots-clés : radioimmunothérapie alpha, astate-211, astate hypervalent, précurseur organostannique.

NEW METHOD FOR THE RADIOLABELLING OF THE ANTIBODIES WITH HYPERVALENT ASTATINE-211 FOR THE ALPHA-RADIOIMMUNOTHERAPY OF CANCERS

Astatine-211 is a promising alpha emitter for the therapy of cancers. In association with a suited immunologic carrier, it could allow the treatment of some micrometastasis or residual cancer diseases. However, the lack of stability of the radiolabelling of the antibodies with this radionuclide is a limitation for the development of clinical applications.

This work describes a new approach for the radiolabelling of the antibodies with astatine-211. The specificity of this method is the use for the first time of hypervalent astatine. Tin precursors were designed to allow the introduction of astatine-211 under a stabilised trivalent state. The feasibility study of the radiolabelling of the antibodies with this method and the preliminary stability assessments are also described.

Keywords: alpha-radioimmunotherapy, astatine-211, hypervalent astatine, organotin precursor.

François GUERARD

Inserm U892. Centre de recherche en cancérologie de Nantes Angers

Equipe de recherche en oncologie nucléaire

Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes

8, quai Moncousu

44007 NANTES