
Résumé

La tomographie par émission de positons est une technique largement utilisée en médecine nucléaire pour le diagnostic clinique. Grâce à ses caractéristiques physicochimiques, le fluor-18 est le radionucléide de choix pour le marquage de composés radiopharmaceutiques utilisés en TEP. Un grand nombre de biomolécules sont utilisées comme radiotraceurs. La difficulté majeure est de venir greffer un atome de fluor-18 sur ces composés organiques. Cette incorporation nécessite des conditions douces, c'est pourquoi un groupement [^{18}F]prosthétique pouvant être lié à une fonction de la biomolécule est habituellement préféré à une introduction directe du fluor-18 sur cette dernière. Lors de cette thèse, deux techniques ont été développées pour marquer d'une part une tyrosine présente dans un peptide et d'autres part un siRNA via un groupement [^{18}F]prosthétique. Lors de la première méthode, le groupement [^{18}F]prosthétique réagissant spécifiquement avec les tyrosines mis au point est le [^{18}F]F-PTAD. Ce dernier a été couplé à une tyrosine avec un rendement radiochimique global (synthèse, couplage, purification) de 20% (DC) en 2h30. Durant la deuxième partie de ce travail, deux linkers porteurs d'une fonction alcyne ont été développés. Ces derniers ont été liés au siRNA et ont ensuite réagi avec un [^{18}F]synthon porteur d'un azoture via une réaction de cycloaddition de Huisgen. Le [^{18}F]siRNA est alors obtenu avec un rendement radiochimique global de 12% (DC) en 2h00. En conclusion, deux méthodes de marquage de biomolécules ont donc été développées.

Summary

Positron Emission Tomography is a highly sensitive imaging technique currently available in nuclear medicine for diagnostic. In regard to his physical and nuclear characteristics, fluorine-18 appears often as the radionuclide of choice for the preparation of short-lived positron-emitter radiotracers for PET studies. The fluorine-18 labelling reaction for biomolecules requires very mild conditions. The current method for highly efficient fluorine-18 labelling of biomolecules is the conjugation of a [^{18}F]prosthetic group with a reactive function on the organic compound. During this thesis, two techniques were developed to label biomolecules via a [^{18}F]prosthetic group: the first one to label tyrosine-containing peptides and the second one to label a siRNA. The first part of this work presents the synthesis of the [^{18}F]F-PTAD which is an agent for specific radiolabelling of tyrosine. [^{18}F]F-PTAD was coupled with a tyrosine with a global radiochemical yield (synthesis, coupling, purification) of 20% (DC) and the synthesis lasts 2h30. During the second part of this work, two alkyne-bearing linkers were synthesized. These linkers were ligated with siRNA and then reacted with azide-bearing [^{18}F]prosthetic group via a Huisgen cycloaddition reaction. The [^{18}F]siRNA is then obtained with a global radiochemical yield of 12% (DC) and the synthesis lasts 2h00. In conclusion, two methods for labelling biomolecules have been developed.

Remerciements

En premier lieu, je remercie vivement mon promoteur, Pr André Luxen, de m'avoir fait confiance en me permettant de réaliser cette thèse au Centre de Recherches du Cyclotron. Merci d'avoir supervisé mes recherches en me laissant une grande liberté et une autonomie de travail. Merci pour votre soutien et vos conseils.

Je tiens également à remercier Pr Loïc Quinton pour avoir accepté d'être le président de mon jury de thèse.

Je remercie également les membres de ce jury, Dr. Simon Lacroix, Dr. Didier Le Bars et Dr. Frédéric Mievis pour avoir accepté de prendre du temps pour lire ce manuscrit et d'évaluer ce travail. Je remercie tout particulièrement Dr. Christian Lemaire pour sa disponibilité et ses conseils avisés durant toutes mes années au CRC.

Ces quelques années de thèse m'ont permis de côtoyer pas mal de monde. C'est pourquoi je tiens d'abord à remercier les membres du cyclotron, anciens et actuels, que j'ai pu rencontrer. Merci à Nathalie T., Frédéric M., David T., Jérôme P., David D., Lionel L., Geoffroy K., Eve G., Corentin W., Sylvestre D., sans oublier le « +4 » pour votre soutien, vos conseils et aussi les liens d'amitiés qui se sont créés. Merci aussi à toute l'équipe du CQ, l'équipe de production et le secrétariat pour leur bonne humeur et leur gentillesse.

Ensuite, je remercie l'équipe du département de chimie, professeurs, assistants, doctorants, préparateurs, secrétaires,... pour ces 6 années d'assistantat passées dans la bonne humeur en votre compagnie.

Je remercie également les chimistes avec qui j'ai partagé mes années de licence pour les excellents moments passés en leur compagnie. En particulier, Daureen et Sébastien avec qui j'ai gardé des liens d'amitié très forts.

Merci à mes parents de m'avoir laissé la possibilité de faire le cursus que j'ai choisi tout au long de mes études et de m'avoir soutenu dans mes choix.

Finalement, je tiens à remercier mon époux Damir qui me soutient et me supporte depuis le début de ce travail de thèse et mon fils Bastien qui est né lors de la rédaction finale de ce manuscrit.

Table des matières

1	INTRODUCTION.....	1
1.1	Techniques de détection	1
1.1.1	La tomographie par émission monophotonique (TEMP ou SPECT)	2
1.1.2	Tomographie par émission de positons (TEP).....	4
1.2	Composés radiopharmaceutiques.....	6
1.2.1	Utilisation de radionucléides métalliques.....	8
1.2.1.1	Marquage direct de biomolécules.....	11
1.2.1.2	Le marquage indirect de biomolécules	12
1.2.1.2.1	Méthode 1 : Complexation par l'agent chélatant puis liaison avec la biomolécule	13
1.2.1.2.2	Méthode 2 : Liaison du chélatant avec la biomolécule puis complexation	14
1.2.1.2.3	Chélatants.....	15
1.2.2	Utilisation de radionucléides de très courtes demi-vies	16
1.2.3	Utilisation de radionucléides halogénés	18
1.2.3.1	Brome et iode.....	19
1.2.3.1.1	Substitution électrophile	20
1.2.3.1.2	Utilisation d'un groupement prosthétique	21
1.2.3.2	Fluor	22
1.2.3.2.1	Voie électrophile	22
1.2.3.2.2	Voie nucléophile.....	23
1.2.3.2.2.1	Substitution nucléophile aromatique.....	24
1.2.3.2.2.2	Substitution nucléophile aliphatique	25
1.2.3.2.3	Le fluor-18 comme radionucléide TEP	25

1.3	Marquage de peptides	27
1.3.1	Exemples de groupements prosthétiques.....	28
1.3.2	Méthodes de liaison	30
1.4	Marquage de siRNA	34
1.4.1	Utilisation d'oligonucléotides comme agents thérapeutiques	35
1.4.2	Utilisation de siRNAs comme agents thérapeutiques	35
1.4.3	Stabilité des oligonucléotides et des siRNAs.....	36
1.4.4	Techniques de marquage des oligonucléotides et des siRNAs	37
2	BUT DU TRAVAIL	43
3	RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.....	45
3.1	Marquage de tyrosine	45
3.1.1	Synthèse et marquage d'un précurseur analogue au PTAD	49
3.1.1.1	Synthèse de précurseurs aromatiques	49
3.1.1.1.1	4-(4-nitrophényl)-3H-1,2,4-triazole-3,5(4H)-dione...	49
3.1.1.1.2	4-(4-nitrophényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione.....	54
3.1.1.1.3	4-(1,2-bis(tert-butoxycarbonyl)-3,5-dioxo-1,2,4- triazolidin-4-yl)-N,N,N-triméthylbenzenammonium trifluoromethanesulfonate	58
3.1.1.2	Synthèse d'un précurseur aliphatique	59
	Synthèse du 4-(4-(2-tosyloxyéthoxy)phényl)-1,2,4-triazolidine- 3,5-dione.....	59
3.1.2	Radiosynthèse du [¹⁸ F]-PTAD	64
3.1.2.1	Synthèse manuelle.....	65
3.1.2.2	Automatisation sur FastLab®	71

3.1.3	Couplage entre le [¹⁸ F]F-PTAD et la N-acétyl tyrosine méthylamide	72
3.2	Marquage de siRNA	76
3.2.1	Synthèse de linker.....	76
3.2.1.1	Synthèse du linker 27 : le (2S,4R)-N-(6-heptynoyl)-4-hydroxy prolinol	78
3.2.1.2	Synthèse du linker 28 : le N-((2R,3R)-1,3-dihydroxy-2-butanyl)-6-heptynamide.....	95
3.2.2	Synthèse d'un siRNA modifié par le linker 27	101
3.2.3	Radiochimie	102
3.2.3.1	Synthèse de la référence froide.....	103
3.2.3.2	Synthèse du [¹⁸ F]siRNA	105
4	CONCLUSIONS.....	109
5	MATÉRIEL ET MÉTHODES	113
5.1	Généralités	113
5.1.1	Spécificité pour le marquage de la tyrosine	114
5.1.2	Spécificité pour le marquage de siRNA	114
5.2	Marquage de tyrosine	115
5.2.1	Synthèse des précurseurs et références froides.....	115
5.2.2	Radiochimie	121
5.2.2.1	Radiosynthèse du [¹⁸ F]F-PTAD	121
5.2.2.2	Couplage entre le [¹⁸ F]F-PTAD et la N-acétyl tyrosine méthylamide.....	124
5.3	Marquage de siRNA	125
5.3.1	Synthèse des linkers	125

Table des matières

5.3.2	Synthèse du siRNA	139
5.3.2.1	Brin sens et antisens.....	139
5.3.2.2	Synthèse du siRNA double brin.....	140
5.3.3	Chimie Click : synthèse du [¹⁹ F]siRNA.....	140
5.3.4	Radiochimie	141
6	RÉFÉRENCES.....	143
7	ANNEXES.....	157
7.1	Annexe 1	157
7.2	Annexe 2	157

Liste des abréviations

A	Adénine
Ac	Acétyle
ACN	Acétonitrile
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique (=RNA)
Boc	tert-butoxycarbonyle
C	Cytosine
CPG	Controlled pore glass
DC	Decay Corrected
DIEA	Diisopropyléthylamine
DMAP	Diméthylaminopyridine
DMF	Diméthylformamide
DMS	Diméthylsulfure
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMTr	Diméthoxytrityle
DOTA	Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-N,N',N'',N'''- tétraacétique
DTPA	Acide N-diéthylènetriaminopentaacétique
EC	Electronic capture
ESI	Electrospray ionization
Et	Ethyle
Fmoc	Fluorenylméthoxyloxycarbonyle
G	Guanine
HBTU	N,N,N',N'-Tetramethyl-O-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate
HDMS	Hexaméthylidisilazane
HPLC	High performance liquid chromatography
imH	Imidazole

Liste des abréviations

IRM	Imagerie par résonance magnétique
IT	Isomeric transition
Me	Méthyle
MS	Mass spectrometry
NBS	N-bromosuccinimide
NOTA	Acide 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacétique
ON	Oligonucléotide
PTAD	4-phényl-3 <i>H</i> -1,2,4-triazoline-3,5(4 <i>H</i>)-dione
Py	Pyridine
QMA	Quaterny methyl ammonium
R _f	Facteur de rétention
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RNA	Ribonucleic acid (=ARN)
siRNA	Small interfering RNA
SPECT	Single photo emission computed tomography (=TEMP)
TBAF	Fluorure de tétrabutylammonium
TBTA	Tris[(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine
TEMP	Tomographie d'émission monophotonique (=SPECT)
TEP	Tomographie par émission de positons
TETA	Acide 1,4,8,11-tétraazacyclotetradecane-1,4,8-11-tetraacétique
THF	Tétrahydrofurane
TIPS	Triisopropylsilyl
TLC	Thin layer chromatography (Chromatographie sur couche mince)
TMS	Triméthylsilyle
Tos	Tosylate
t _R	Temps de rétention

Liste des abréviations

TSTU	<i>N,N,N',N'</i> -Tetraméthyl- <i>O</i> -(<i>N</i> -succinimidyl)uronium tetrafluoroborate
TTH	2-thiazolin-2-thiol
U	Uracile
UPLC	Ultra performance liquid chromatography
UV	Ultraviolet

1 Introduction

1.1 Techniques de détection

Les principales techniques utilisées en imagerie médicale pour la détection des composés radiopharmaceutiques marqués à l'aide d'un radionucléide (voire paragraphe 1.2) sont la tomographie d'émission monophotonique (TEMP), ou SPECT (single photo emission computed tomography) en anglais, et la tomographie par émission de positons (TEP).

Celles-ci diffèrent des techniques d'imagerie telles que l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ou les rayons-X qui fournissent uniquement des informations sur l'anatomie, alors que la TEP et la SPECT donne des informations sur les processus métaboliques chez l'homme ou chez l'animal. Ces deux dernières nécessitent donc l'utilisation d'une sonde radioactive, un composé radiopharmaceutique, fournissant un signal détectable.

L'utilisation de l'une ou l'autre de ces deux techniques dépend du radionucléide utilisé et greffé sur le composé radiopharmaceutique. La SPECT nécessite l'utilisation d'un composé radiopharmaceutique contenant un radionucléide émetteur de rayons gammas. La TEP, quant à elle, nécessite l'utilisation d'un composé radiopharmaceutique marqué à l'aide d'un émetteur de positons (β^+). Les paragraphes suivants en décrivent le fonctionnement

1.1.1 La tomographie par émission monophotonique (TEMP ou SPECT)

En SPECT, un composé radiopharmaceutique porteur d'un radionucléide émetteur de rayonnements gamma est injecté chez le patient. Ces rayons gamma sont captés par une gamma caméra constituées de deux têtes de détection planes tournant autour du patient.



Fig. 1 Scanner SPECT

Ces têtes de détection sont essentiellement composées de photomultiplicateurs disposés sur un cristal de scintillation NaI et d'un collimateur. Le collimateur, positionné devant le cristal de NaI, exclut les radiations ne venant pas d'une direction perpendiculaire à la surface de la gamma caméra. Ces caméras captent des images 2D sous plusieurs angles et grâce à un algorithme de reconstruction tomographique, la carte 3D de la distribution du composé radiopharmaceutique dans l'organisme peut être estimée. Ceci est repris dans la figure 2.

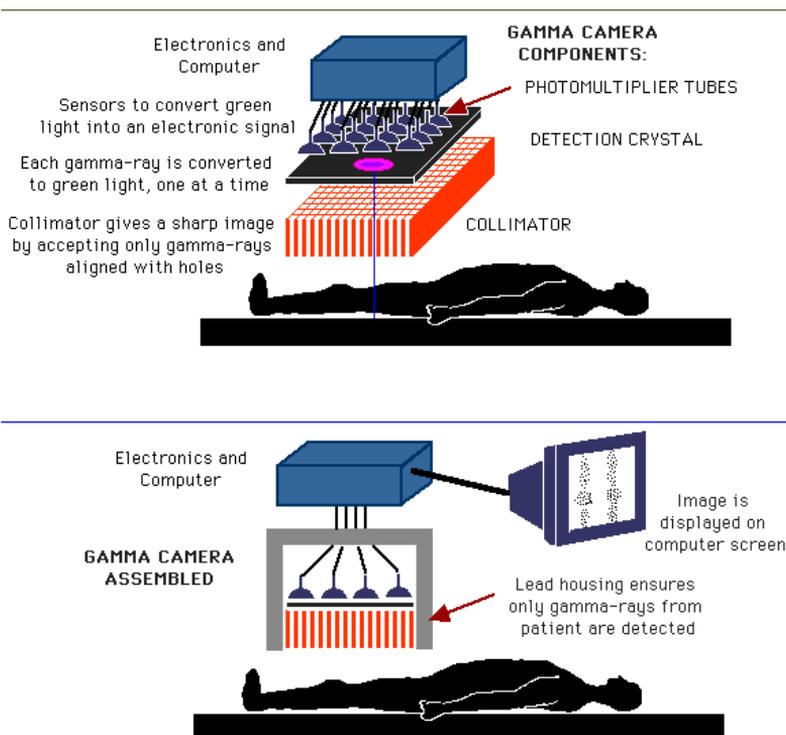


Fig. 2 SPECT: gamma camera

La tomographie par émission monophotonique peut être appliquée à toutes les parties du corps. Le temps d'acquisition pour obtenir des images SPECT est relativement long, notamment à cause du temps qu'il faut aux détecteurs pour tourner autour du patient. Durant toute la rotation du détecteur autour du patient, la distribution du composé radiopharmaceutique injecté doit être la même. Celui-ci doit donc être bien choisi, son élimination ne doit pas être trop rapide et le radionucléide doit avoir une demi-vie suffisamment longue.

Le succès de cette technique est principalement dû à son association avec le radionucléide technétium-99m porté par différents composés radiopharmaceutiques. (1).

1.1.2 Tomographie par émission de positons (TEP)

Au cours de ces 4 dernières décennies, la tomographie par émission de positons est devenue un outil essentiel utilisé en médecine nucléaire pour le diagnostic clinique. La TEP permet la visualisation des tissus *in vivo*, permettant la détection de certaines pathologies. Elle donne des informations sur le métabolisme, les fonctions récepteurs-enzymes et les mécanismes biochimiques, ce qui rend notamment cette technique indispensable dans le développement des stratégies anticancéreuses, mais également en cardiologie ou en neurologie. En imagerie cérébrale, elle permet de révéler les régions actives du cerveau lors de telle ou telle activité cognitive. Cette technique permet de mesurer le composé radiopharmaceutique de façon quantitative, ce qui la rend complémentaire des autres techniques, comme les rayons X ou l'imagerie par résonance magnétique. (2, 3)



Fig. 3 Tomographe TEP

Dans cette technique, un composé radiopharmaceutique porteur d'un radionucléide émetteur de positons est injecté chez le patient. Le positon émis rencontre dans son environnement très proche (2-8 mm) un électron et les deux particules s'annihilent. Cette annihilation provoque l'émission de deux photons gamma, dans des directions opposées, à 180°C l'un de l'autre. Ces deux photons possèdent une énergie de 511 keV. Les détecteurs du scanner TEP, se situant autour du patient,

détectent ces deux photons gamma simultanément (en coïncidence), ce qui permet la localisation du lieu de leurs émissions et donc la concentration du traceur en chaque point de l'organe cible. La TEP ne détecte donc pas l'endroit où le radionucléide émet mais il détecte la position à laquelle le positon est annihilé. La distance entre les deux augmente avec l'énergie des positons. Plus l'énergie du positon est faible, plus la résolution des images obtenues sera meilleure. Contrairement à la technique SPECT, aucun collimateur n'est nécessaire en tomographie par émission de positons. (Fig. 4)

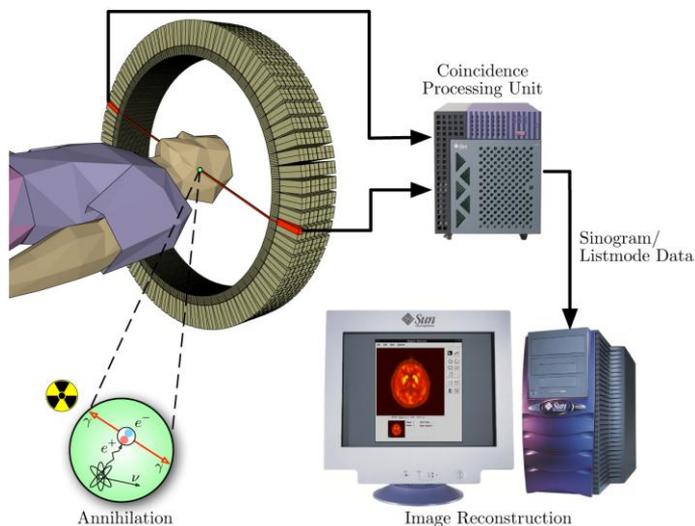


Fig. 4 Principe de la tomographie par émission de positons

La tomographie par émission de positons, comparée à la SPECT, est une technique avec une sensibilité, une résolution et une quantification meilleures.(1, 4, 5) La SPECT nécessite plus d'une demi-heure pour obtenir des données qui peuvent être obtenues en quelques minutes seulement en TEP.

Un autre avantage de la TEP par rapport à la SPECT est que les radionucléides utilisés en TEP sont souvent des radionucléides

« naturels » (^{11}C , ^{13}N , ^{15}O) (voire paragraphe 1.2.2). Ils ne changent pas le comportement biochimique de la molécule marquée. Par contre, la SPECT utilise des radionucléides, souvent métalliques (voire paragraphe 1.2.1), qui ne sont pas naturellement présents dans les biomolécules. Leur introduction, nécessitant d'une part un agent chélatant (voire paragraphe 1.2.1.2), demande, d'autre part, de réaliser des études préalables pour vérifier que ces biomolécules marquées sont toujours stables et ont conservé leur activité biologique.

Le composé radiopharmaceutique le plus utilisé en tomographie par émission de positons est le [^{18}F]-2-fluoro-2-deoxyglucose ([^{18}F]FDG) (6). Ce dernier agit comme un analogue du glucose permettant la visualisation de la consommation *in vivo* de glucose, particulièrement importante dans les tumeurs. C'est grâce à son incroyable boom que des groupes de chercheurs ont développé d'autres composés radiopharmaceutiques pour le diagnostic en TEP. (1, 7).

1.2 Composés radiopharmaceutiques

Un composé radiopharmaceutique est un médicament contenant un radionucléide utilisé dans un but thérapeutique ou de diagnostic. Il permet de délivrer des radiations ionisantes à l'intérieur d'un site-cible dans le corps. Depuis plusieurs années, les biomolécules marquées en tant que composés radiopharmaceutiques sont devenues des outils incontournables en médecine nucléaire.

Ces composés organiques peuvent être de faible masse moléculaire, comme des peptides, ou alors des macromolécules comme, par exemple, des anticorps, des oligonucléotides ou des protéines. Ces composés radiopharmaceutiques, à l'instar des traitements de chimiothérapie classiques, sont extrêmement spécifiques.

Le chemin suivi par le composé radiopharmaceutique, de sa synthèse jusqu'aux images obtenues grâce aux techniques d'imagerie médicale, est représenté dans la figure 5. Une fois le radionucléide produit, par exemple grâce à un cyclotron, la biomolécule est marquée. La technique de marquage utilisée dépend du radionucléide choisi. Plusieurs d'entre elles sont expliquées dans la suite de ce chapitre. Le composé radiopharmaceutique obtenu est injecté chez le patient après une purification, une formulation (rendre la solution injectable chez l'homme ou l'animal) et un contrôle qualité. Le composé radiopharmaceutique est alors acheminé vers sa cible dans le corps. Ensuite, par différentes techniques d'imagerie médicale et après traitement informatique, les images de la biodistribution du composé radiopharmaceutique dans le corps sont obtenues.

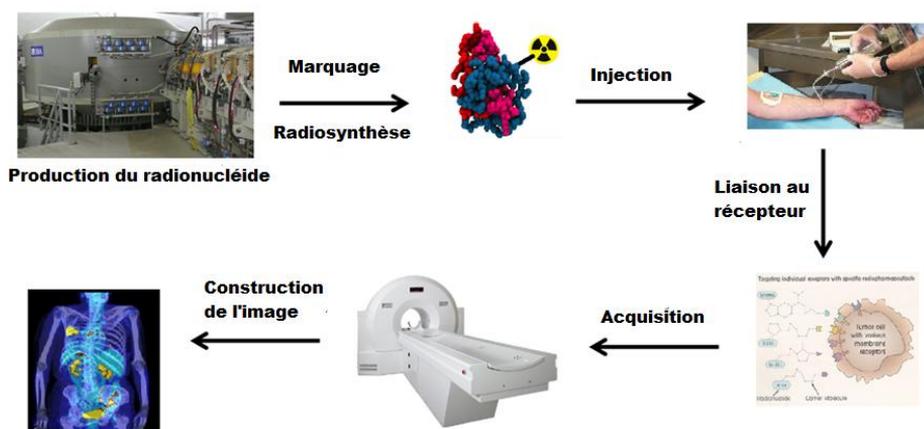


Fig. 5 Synthèse et utilisation d'un composé radiopharmaceutique

Le choix du composé radiopharmaceutique injecté au patient dépendra de l'organe cible, du récepteur, du mécanisme d'action à étudier et du métabolisme *in vivo* de cette biomolécule.

La nature du radionucléide est également importante. Celui-ci est choisi en fonction de ses propriétés physiques et nucléaires. Sa demi-vie

est un facteur critique. Le choix du radionucléide en fonction de sa demi-vie est lié à la pharmacocinétique de la biomolécule. La demi-vie du radionucléide doit être compatible avec le temps nécessaire à la synthèse du composé radiopharmaceutique et à son accumulation dans les organes cibles. Par exemple, les radionucléides de courtes demi-vies (quelques heures) sont suffisants pour marquer des composés radiopharmaceutiques ciblant le cœur ou le cerveau car ceux-ci atteignent rapidement leur cible. Alors que certains anticorps monoclonaux prennent plus de temps pour atteindre leur tumeur-cible, ceux-ci nécessiteront des radionucléides possédant une demi-vie plus longue (>24h). (5, 8)

Les radionucléides les plus couramment utilisés en imagerie nucléaire peuvent être classés en trois sous-groupes : les radionucléides métalliques, les radionucléides dits « naturels » ou de courtes demi-vies et les radiohalogènes. Ces différentes classes de radionucléides sont reprises dans les trois sous-chapitres suivants.

1.2.1 Utilisation de radionucléides métalliques

La première classe de radionucléides utilisés en imagerie nucléaire sont les radionucléides métalliques. La table 1 en reprend une liste non-exhaustive, leur demi-vie, leur mode de décroissance ainsi que le mode de production principal. Une distinction est faite entre les radionucléides utilisés en radiothérapie et ceux utilisés dans un but de diagnostic.

Radionucléide	Demi-vie	Mode de décroissance ¹	Source ²
Radionucléides utilisés en thérapie			
⁶⁴ Cu	12,7 h	EC (24%), β ⁺ (17,4%), β ⁻ (39%)	⁶⁴ Ni(p,n) ⁶⁴ Cu
⁹⁰ Y	64,1h	β ⁻ (100%)	⁹⁰ Sr → ⁹⁰ Y
¹⁷⁷ Lu	6,71 j h	β ⁻ (100%)	¹⁷⁶ Lu(n,γ) ¹⁷⁷ Lu
¹¹¹ In	2,83 j	EC (100%) ³	¹¹¹ Cd(p,n) ¹¹¹ In
Radionucléides utilisés pour le diagnostic (PET et/ou SPECT)			
⁵⁵ Co	17,5h	EC (23%), β ⁺ (77%)	⁵⁸ Ni(p,α) ⁵⁵ Co
⁶⁸ Ga	68 min	EC (10%), β ⁺ (90%)	⁶⁸ Ge → ⁶⁸ Ga
⁸⁶ Y	14,7h	EC (67%), β ⁺ (33%)	⁸⁶ Sr(p,n) ⁸⁶ Y
⁸⁹ Zr	3,3 j	EC (77%), β ⁺ (23%)	⁸⁹ Y(p,n) ⁸⁹ Zr
^{99m} Tc	6,02 h	IT (100%)	⁹⁹ Mo → ^{99m} Tc

Table 1 Radionucléides métalliques. (8-10)

La radiothérapie utilisant un radionucléide métallique permet de cibler la partie du corps humain à irradier avec un minimum d'effet néfaste sur les tissus voisins. A l'intérieur de l'organisme, le radionucléide porté par le composé radiopharmaceutique éjecte un électron (particules β⁻ ou électrons Auger) qui interagit avec un atome voisin, souvent d'une molécule d'eau, et perd son énergie menant à une génération d'atomes

¹ EC = capture électronique : ${}^A_ZX + e^- \rightarrow {}^A_{Z-1}Y + \nu_e + \text{émission de photons}$.
 β⁺ = émission d'un positon : ${}^A_ZX \rightarrow {}^A_{Z-1}Y + e^+ + \nu_e$. β⁻ = émission d'un électron :
 ${}^A_ZX \rightarrow {}^A_{Z+1}Y + e^- + \bar{\nu}_e$. IT = transition isomérique : ${}^A_ZX^m \rightarrow {}^A_ZY + \gamma$

² Production dans un cyclotron (par exemple : ${}^{58}\text{Ni}(p,\alpha){}^{55}\text{Co}$) ou à l'aide d'un générateur (par exemple : ${}^{99}\text{Mo} \rightarrow {}^{99m}\text{Tc}$).

³ Electrons Auger

excités et ionisés et de radicaux qui sont responsables de dommages sur l'ADN des cellules voisines.

Le cuivre-64, possédant trois modes de décroissance, et l'indium-111, émetteur d'électrons Auger, ont l'avantage de pouvoir être utilisés comme outil thérapeutique mais également en diagnostic. L'indium-111 ne peut être utilisé en thérapie que si le composé radiopharmaceutique porteur de ce radionucléide pénètre dans la cellule car l'énergie des électrons Auger émis est très faible et cela donne donc une courte pénétration des tissus. (11) Pour estimer la dose thérapeutique optimale et obtenir des images du composé radiopharmaceutique dans le corps, un émetteur de particules β^+ ou de particules γ analogue à l'émetteur de particules β^- est nécessaire (par exemple : l'yttrium-86 analogue de l'yttrium-90).

Pour le diagnostic, les radionucléides émetteurs de particules β^+ sont utilisés en TEP, et ceux émetteurs de particules γ sont utilisés en SPECT. Ces deux techniques d'imagerie ont été développées au paragraphe 1.1.

Intéressons-nous maintenant aux méthodes existantes pour marquer ces biomolécules à l'aide d'un radionucléide métallique. Cette incorporation peut s'effectuer de deux manières : par marquage direct ou par marquage indirect. Le choix de la méthode dépend de la biomolécule à marquer. (9, 12)

1.2.1.1 Marquage direct de biomolécules

La première méthode, le marquage direct, consiste à introduire le radionucléide directement sur une fonction active de la biomolécule. Cette technique est utilisée avec le technétium-99m. Celui-ci est greffé sur une protéine cible à l'aide de quatre groupements thiols (12-15).

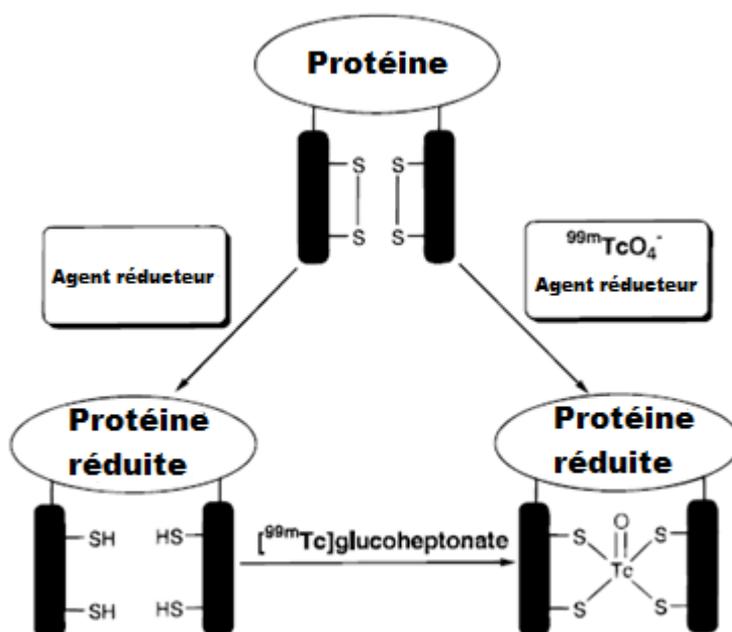


Fig. 6 Marquage direct d'une protéine au ^{99m}Tc (12)

Même si cette approche est très facile à mettre en place, elle possède néanmoins certains inconvénients. Tout d'abord, le processus de marquage s'effectue dans des conditions réductrices ce qui peut mener à des modifications structurales de la protéine. De plus, la position de marquage est difficilement contrôlable. (16) Ensuite, la stabilité et les propriétés pharmacocinétiques de la biomolécule marquée peuvent également être altérées. (17) Dans ce type de marquage, le

technétium se trouve directement sur le motif de la biomolécule se liant à son récepteur-cible, ce qui peut produire une perte d'affinité entre eux. Enfin, cette méthode n'est pas applicable aux petits peptides qui ne possèdent pas de ponts disulfures. Et finalement, cette technique est uniquement utilisable avec du technétium-99m. Lors de l'utilisation d'autres radionucléides métalliques, un marquage indirect doit être réalisé.

1.2.1.2 Le marquage indirect de biomolécules

Le marquage indirect des biomolécules est le plus répandu. Il consiste à lier le radionucléide métallique à la biomolécule-cible via un agent chélatant. (Fig. 7) Des groupes fonctionnels, présents naturellement ou introduits volontairement par le biais d'une petite molécule de liaison (linker) sur la biomolécule, sont utilisés pour l'attachement de cet agent chélatant. (12, 15) Dans ce cas-ci, le radionucléide et donc l'agent chélatant n'interviennent pas dans la liaison entre la biomolécule et son récepteur-cible, cela minimise donc les risques d'interférences et de perte d'affinité.

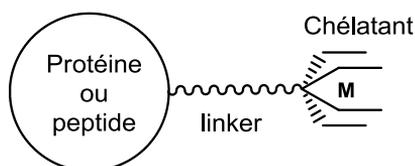


Fig. 7 Liaison d'un radionucléide métallique à une biomolécule via un agent chélatant

Deux techniques existent pour le marquage d'une biomolécule à l'aide d'un agent chélatant. Dans la première, le radionucléide est complexé par l'agent chélatant et le tout est ensuite lié à la biomolécule (Fig. 8). Dans la deuxième, c'est le processus inverse, l'agent chélatant est couplé à la biomolécule avant l'introduction du radionucléide (Fig. 9).

1.2.1.2.1 Méthode 1 : Complexation par l'agent chélatant puis liaison avec la biomolécule

Dans cette première technique, la biomolécule n'est pas exposée aux conditions nécessaires pour la chélation, ce qui lui évite toutes dégradations éventuelles. (Fig. 8)

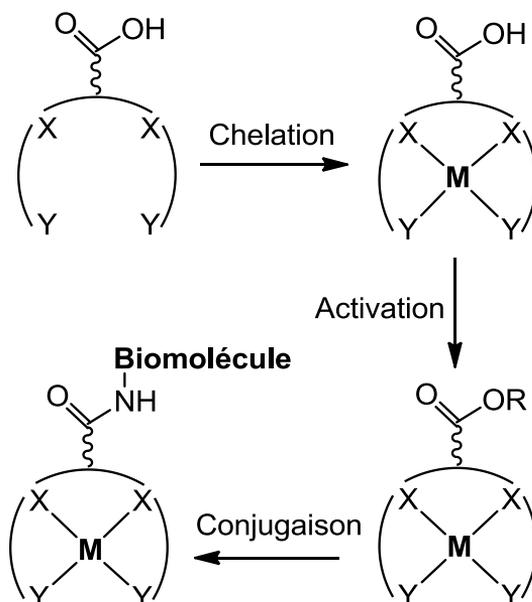


Fig. 8 Complexation du radionucléide suivie du couplage chélatant-biomolécule (12)

Cependant, l'introduction du radionucléide dès la première étape de synthèse du composé radiopharmaceutique n'est pas idéale. Plus les étapes de synthèse sont nombreuses après marquage, plus la synthèse est difficile à mettre en œuvre. De plus, il faudra partir avec une quantité importante de radioactivité, ce qui augmente considérablement l'exposition de l'opérateur aux radiations.

1.2.1.2.2 Méthode 2 : Liaison du chélatant avec la biomolécule puis complexation

Dans la deuxième technique, le radionucléide est introduit lors de la dernière étape. Cette approche est la plus couramment utilisée. (Fig. 9)

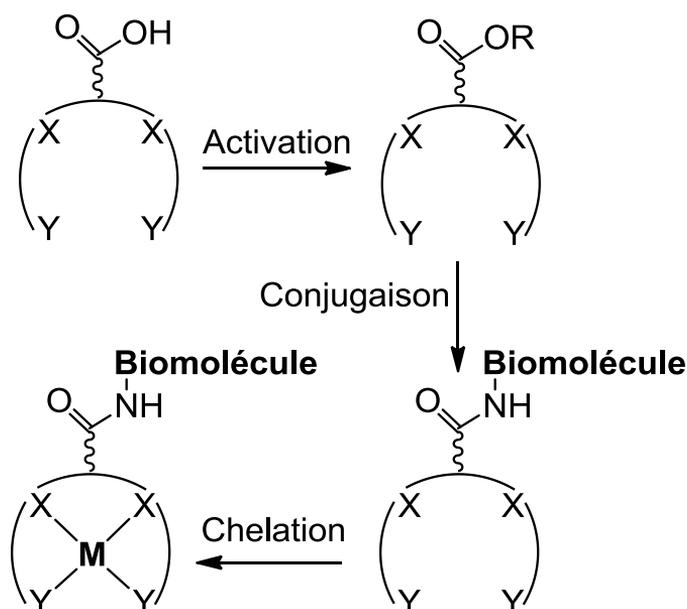


Fig. 9 Couplage chélatant-biomolécule suivie du marquage (12)

Le choix du chélatant est déterminé par la nature du radionucléide métallique. La chimie de coordination de ce dernier détermine la géométrie du chélatant et influence la stabilité du complexe chélatant-radionucléide. Il peut être également choisi sur base de son comportement biologique : ses charges, sa taille, sa stéréochimie, sa lipophilicité, ... (17) Un mauvais choix d'un agent chélatant peut modifier drastiquement la pharmacocinétique, la distribution et le métabolisme du composé radiopharmaceutique.

1.2.1.2.3 Chélatants

Parmi les chélatants les plus courants, citons le DTPA (acide N-diéthylènetriaminopentaacétique), le DOTA (acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-N,N',N'',N'''-tétraacétique), le NOTA (acide 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacétique) et le TETA (acide 1,4,8,11-tétraazacyclotetradécane-1,4,8-11-tétraacétique). Ces derniers sont représentés dans la figure 10.

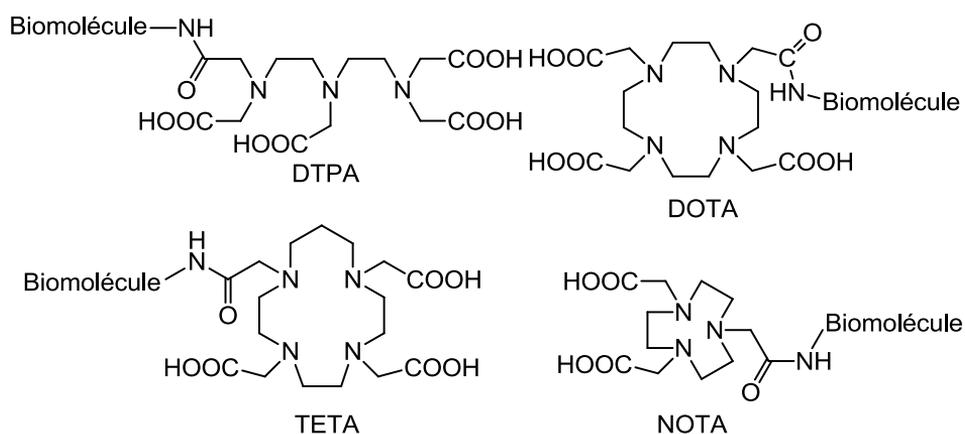


Fig. 10 Quelques chélatants couramment utilisés

LE DTPA est habituellement lié au technétium-99m, à l'indium-111 ou au gallium-68. Il peut être lié à des peptides ou à des protéines (par exemple : albumines ou anticorps). (18, 19) Le DOTA est une très bonne alternative au DTPA car il forme des complexes stables avec une large variété de radionucléides trivalents (^{68}Ga , ^{111}In , ^{90}Y ,...) et de radionucléides divalents (^{64}Cu ,...). (20-25) Cependant, des études récentes ont démontré que le NOTA est un meilleur chélatant que le DOTA. La cavité macrocyclique du NOTA étant plus petite, la stabilité du complexe ^{68}Ga -NOTA est améliorée par rapport à celle du complexe ^{68}Ga -DOTA. Le marquage des radiotraceurs porteurs d'un NOTA, au lieu d'un DOTA, s'effectue à des températures plus faibles, ce qui diminue le

risque de dégradation de la biomolécule. (26-29) Le chélatant TETA est, quant à lui, surtout utilisé pour la complexation du cuivre. (8, 30, 31)

L'inconvénient des chélatants utilisés lors du marquage d'un composé radiopharmaceutique par un radionucléide métallique, est leur manque de sélectivité. Beaucoup d'ions métalliques (Zn^{2+} , Al^{3+} , $Fe^{2+/3+}$, ...) provenant soit du matériel utilisé, soit des produits de décroissance, peuvent également être complexés par ces macrocycles. Ce qui diminue le rendement de marquage et l'activité spécifique⁴. (25)

1.2.2 Utilisation de radionucléides de très courtes demi-vies

La deuxième classe de radionucléides utilisés en imagerie nucléaire reprend les radionucléides dits « naturels » ou de très courtes demi-vies, à savoir l'oxygène-15, l'azote-13 et le carbone-11. L'avantage de ces radionucléides est leur présence naturelle dans les biomolécules. Les composés radiopharmaceutiques porteurs de ces radioisotopes se comportent donc exactement de la même manière, chimiquement et biologiquement, que leurs analogues non marqués sans risque d'altération. La table 2 reprend ces trois radionucléides ainsi que leurs demi-vies, leurs modes de décroissance et de production.

⁴ L'activité spécifique est une mesure de la radioactivité par unité de masse du composé marqué, couramment exprimée en GBq/ μ mol ou Ci/ μ mol.

Radionucléide	Demi-vie	Mode de décroissance	Source
^{11}C	20 min	β^+ (99%)	$^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$
^{13}N	10 min	β^+ (100%)	$^{16}\text{O}(p,\alpha)^{13}\text{N}$
^{15}O	2 min	β^+ (100%)	$^{14}\text{N}(d,n)^{15}\text{O}$ $^{16}\text{O}(p,pn)^{15}\text{O}$

Table 2 Radionucléides dits "naturels"

L'oxygène-15 et l'azote-13 possèdent de très courtes demi-vies. Ce qui signifie qu'ils sont essentiellement disponibles sous leur forme produite dans la cible du cyclotron (Ex : $[^{13}\text{N}]\text{NH}_3$, $[^{15}\text{O}]\text{O}_2$, $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$). (7, 32) La courte demi-vie de ces radionucléides permet des administrations répétées du composé radiopharmaceutique dans un temps relativement court. L'oxygène-15 est utilisé pour détecter des processus possédant une courte demi-vie biologique, tel que le flux sanguin. (32)

Concernant le carbone-11, la demi-vie n'étant que de 20 minutes, la synthèse du composé radiopharmaceutique doit donc être la plus rapide possible et, comme pour les biomolécules marquées à l'oxygène-15 ou à l'azote-13, son utilisation doit se faire dans un rayon proche du centre de production.

En chimie du carbone-11, les deux synthons produits et récupérés directement à la sortie de la cible sont $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ et $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$. A partir de ces deux intermédiaires réactionnels, plusieurs autres $[^{11}\text{C}]$ composés, servant de précurseurs pour le marquage de biomolécules, peuvent être obtenus. Ils sont représentés dans la figure 11. (32)

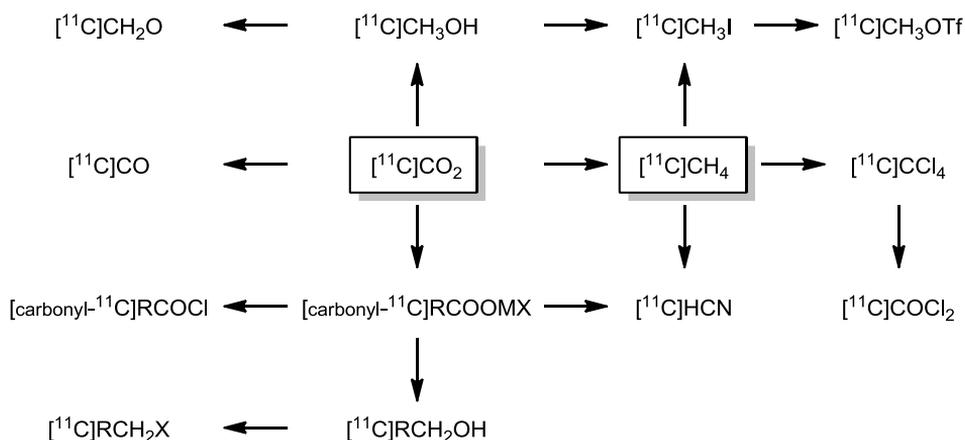


Fig. 11 [^{11}C]précurseurs les plus couramment utilisés (32)

Par exemple, le carbone-11 obtenu sous forme de [^{11}C]CO₂ peut être converti en [^{11}C]formaldéhyde. Ce dernier peut être, par exemple, lié à une fonction amine d'une protéine. (33) Une autre façon plus courante d'introduire un atome de carbone-11 sur un peptide est de remplacer dans ce peptide les méthionines par des homocystéines. Ces dernières réagiront avec de l'iodure de [^{11}C]méthyle pour produire la méthionine voulue mais cette fois marquée au carbone-11. (5)

1.2.3 Utilisation de radionucléides halogénés

La troisième classe de radionucléides utilisés en imagerie nucléaire reprend les radiohalogènes. Les radiohalogènes sont particulièrement utiles pour le marquage de biomolécules car leur chimie est bien connue, ils forment des liaisons covalentes stables et des marquages de haute activité spécifique peuvent être obtenus. (34-36)

Ci-dessous une liste non-exhaustive reprenant certains radionucléides halogénés et leurs caractéristiques principales. (Table 3)

Radionucléide	Demi-vie	Mode de décroissance	Source
Radionucléide utilisé en thérapie			
^{131}I	8 j	β^- (100%)	$^{235}\text{U}(n,f)^{131}\text{I}$
Radionucléides utilisés pour le diagnostic			
^{123}I	13 h	EC (100%)	$^{123}\text{Te}(p,n)^{123}\text{I}$
^{124}I	4,15 j	EC (74%) β^+ (26%)	$^{124}\text{Te}(p,n)^{124}\text{I}$
^{75}Br	97 min	EC (27%) β^+ (73%)	$^{74}\text{Se}(d,n)^{75}\text{Br}$
^{76}Br	16,2 h	EC (46%) β^+ (54%)	$^{76}\text{Se}(p,n)^{76}\text{Br}$
^{77}Br	57 h	EC (99%) β^+ (1%)	$^{75}\text{As}(\alpha,2n)^{77}\text{Br}$
^{18}F	110 min	EC (3%) β^+ (97%)	$^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ $^{20}\text{Ne}(d,\alpha)^{18}\text{F}$

Table 3 Radionucléides halogénés

1.2.3.1 Brome et iode

Le radiohalogène principal utilisé en thérapie est l'iode-131. Ce radioisotope est surtout utilisé pour cibler la thyroïde. Sa capacité à cibler cette glande est 100 fois supérieur à son affinité pour les autres tissus. D'un point de vue diagnostic, la longue demi-vie de l'iode-124, radioisotope analogue de l'iode-131, permet de visualiser des processus physiologiques lents sur une durée de plusieurs jours. Une application de l'iode-123 est l'utilisation du [^{123}I]ioflupane (DaTSCAN). Cette molécule, analogue à la cocaïne, fixe spécifiquement les transporteurs présynaptiques de la dopamine. (37)

Le brome-76 possède une énergie β^+ élevée (3,98 MeV), ce qui donne une mauvaise résolution spatiale (>5mm). (38) Il possède également une demi-vie de 16 heures, la combinaison de ces deux phénomènes entraîne une mauvaise dosimétrie pour le patient. L'inconvénient du brome-75 est sa décroissance en du sélénium-75, élément également instable, possédant une demi-vie de 120 jours (capture électronique). Cependant, la liaison C-Br étant plus forte que celle entre le carbone et l'iode, le composé radiopharmaceutique porteur du brome est métaboliquement plus stable que son analogue iodé.

Pour marquer un composé organique avec un iode ou un brome, ces derniers peuvent être introduit de deux manières différentes : directement par substitution électrophile sur un site aromatique de la biomolécule ou par couplage d'un groupement prosthétique porteur du radiohalogène à cette biomolécule.

1.2.3.1.1 Substitution électrophile

Les radioiodations ou les radiobromations s'effectuent dans des conditions oxydantes (chloramine-T, iodogen). (36) Ces radioéléments peuvent se fixer sur les différents sites aromatiques présents. Cependant, les acides aminés les plus marqués sont les tyrosines grâce à leur groupe hydroxyle activant le cycle. (Fig. 12)

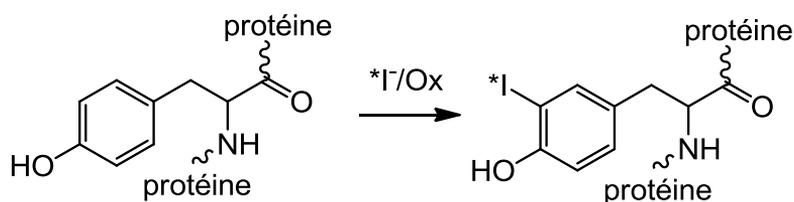


Fig. 12 Radioiodation : substitution électrophile sur une tyrosine

Une alternative à cette méthode nécessitant des conditions oxydantes est l'utilisation de groupements prosthétiques porteurs de l'atome radioactif.

1.2.3.1.2 Utilisation d'un groupement prosthétique

Plusieurs groupements prosthétiques porteurs d'un radioélément iodé ou d'un bromé et dérivés d'une tyrosine ont été décrits. (15, 39) Cependant, ces composés subissent facilement une déshalogénéation par des nucléophiles ou *in vivo* via des déshalogénases. Plusieurs autres groupements prosthétiques dérivés de composés non-phénoliques ont alors été synthétisés ; par exemple au départ de sel de diazonium ou de composés organométalliques. (15, 36, 39) Quelques exemples sont repris dans la figure 13.

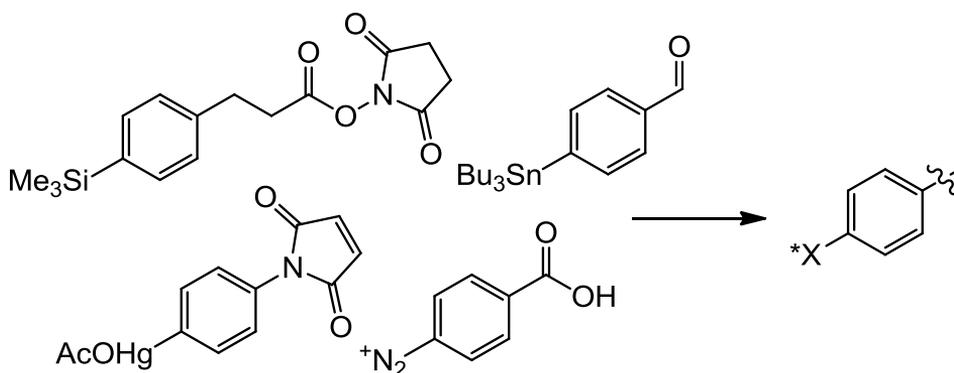


Fig. 13 Réactifs utilisés lors d'une radioiodation ou d'une radiobromation.

*X = *I ou *Br.

Ces groupements prosthétiques iodés ou bromés seront ensuite couplés à une protéine via une fonction amine ou thiol.

1.2.3.2 Fluor

Le fluor-18, produit par cyclotron, est extrait des cibles soit sous forme nucléophile soit sous forme électrophile.

1.2.3.2.1 Voie électrophile

Deux réactions nucléaires existent pour obtenir le fluor sous forme électrophile $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$, $^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$ et $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$. Pour la première réaction nucléaire, l'espèce électrophile du fluor-18 est produite en bombardant une cible gazeuse de néon contenant un faible pourcentage de F_2 (0,25%). Cette technique permet de sortir de la cible quelques millicuries de $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$. Pour la réaction $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$, de l'oxygène-18 gazeux est bombardé, et ensuite éliminé par cryogénisation. Le fluor-18 piqué sur les parois de la cible et alors décroché avec du néon gazeux contenant un faible pourcentage de $[^{19}\text{F}]\text{F}_2$ (0,25%). Cette technique permet de sortir de l'ordre d'une curie de $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$.

Dans les deux cas, l'ajout de fluor gazeux stable est nécessaire pour extraire l'activité de la cible. Dès lors, un atome sur deux de F_2 est marqué, ce qui donne, lors de la radiosynthèse, une faible activité spécifique (quelques $\text{mCi}/\mu\text{mol}$) et un rendement de maximum 50%. Le fluor électrophile permet des réactions d'addition sur doubles liaisons et sur des noyaux aromatiques, mais ces dernières sont souvent décrites comme peu régiosélectives. Il en résulte un faible rendement radiochimique associé à des proportions variables d'isomères de position qu'il est très difficile de séparer par HPLC. (40, 41) Pour gagner en régiosélectivité, il est préférable d'utiliser des réactions de démétallation. (42-44) Un exemple est repris dans la figure 14.

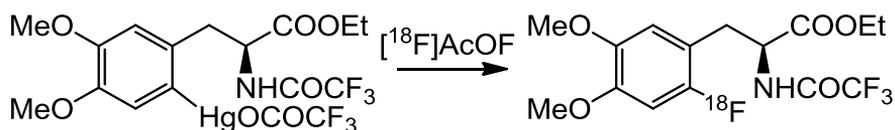


Fig. 14 Marquage électrophile du précurseur de la 6- [¹⁸F]fluoro-3,4-dihydroxy-L-phenylalanine.

Le [¹⁸F]F₂ étant très réactionnel, il est souvent utilisé en solution diluée et à basse température. Sa réactivité a également été modulée par l'utilisation d'hypofluorite d'acétyle ([¹⁸F]AcOF). (45)

1.2.3.2.2 Voie nucléophile

La méthode nucléophile est la plus utilisée dans les centres TEP. L'anion [¹⁸F]F⁻ est produit en bombardant de l'eau enrichie en oxygène-18 via la réaction nucléaire ¹⁸O(p,n)¹⁸F. Le [¹⁸F]F⁻, obtenu sous forme aqueuse, est un mauvais nucléophile à cause de sa solvatation très importante. Pour rendre ces fluorures réactionnels, ils sont piégés sur une QMA (résine échangeuse d'anions) et ensuite élués grâce à une solution de Kryptofix-222 (K₂₂₂) et de K₂CO₃ dans un mélange eau/acétonitrile. Cette solution est ensuite évaporée. Le cryptant K₂₂₂ forme un complexe avec le potassium, ce qui laisse l'ion fluorure « libre » et donc hautement nucléophile quand il est dissous dans un solvant polaire aprotique. (32, 46) . Cette approche est la seule utilisée pour synthétiser un composé radiopharmaceutique avec une haute activité spécifique (~10mCi/μmol). Le [¹⁸F]F⁻ est alors introduit sur la molécule-cible via une réaction de substitution nucléophile aliphatique ou aromatique.

1.2.3.2.1 Substitution nucléophile aromatique

La substitution nucléophile aromatique donne d'excellents rendements lorsque l'anion $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ substitue un bon groupe partant ($-\text{NO}_2$ ou $-\text{N}^+\text{Me}_3$) situé en position ortho ou en position para d'un groupement électroattracteur ($-\text{CHO}$, $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$). (Fig. 15) Les conditions de réaction sont relativement dures, de 80 à 180°C en milieu basique dans un solvant polaire aprotique (DMSO, ACN, DMF) pendant 5 à 15 minutes.

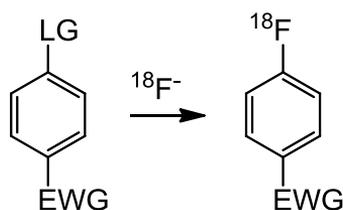


Fig. 15 Substitution nucléophile aromatique. LG = groupe partant. EWG = groupe électroattracteur.

L'ammonium quaternaire est un excellent groupement partant. Il a également l'avantage de permettre une séparation facile du composé marqué de son précurseur. Cependant, il y a un risque de formation de $[^{18}\text{F}]\text{fluorométhane}$. Ce dernier est un composé extrêmement volatil.

Cette réaction de substitution nucléophile aromatique peut également être réalisée sur des hétérocycles. (47) Le marquage d'une pyridine est repris dans la figure 16. Le groupe partant se trouve en position 2 ou en position 4 sur le cycle pyridinique. Les rendements obtenus sont de l'ordre de 80%.

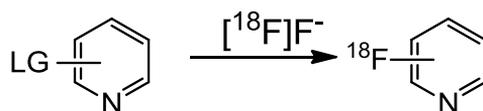


Fig. 16 Substitution nucléophile aromatique sur une pyridine. LG = Groupement partant en position 2 ou 4

1.2.3.2.2 Substitution nucléophile aliphatique

Lors d'une réaction de substitution nucléophile aliphatique, les groupes partants sont habituellement des sulfonates (triflate, mésylate, tosylate,...). Les meilleurs rendements sont obtenus pour les substitutions sur des carbones primaires comme dans les réactions de type SN_2 classiques. Le radiotracteur le plus connu marqué via cette technique est le [^{18}F]FDG. (32) (Fig. 17)

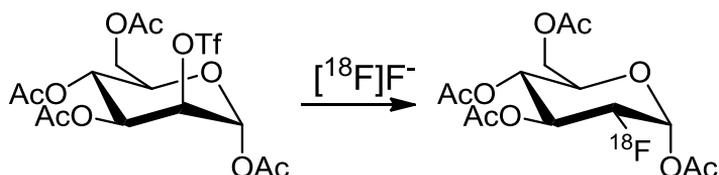


Fig. 17 Marquage via une substitution nucléophile aliphatique du précurseur du [^{18}F]FDG

1.2.3.2.3 Le fluor-18 comme radionucléide TEP

Le fluor-18 est un émetteur de positons couramment rencontré dans la littérature et utilisé dans notre centre de recherches. Grâce à ses propriétés nucléaires et chimiques, il est considéré comme un radionucléide émetteur de positons idéal en tomographie par émission de positons. (32, 46) Citons-en quelques unes :

- Sa demi-vie de 110 minutes permet de disposer de quelques heures ($\approx 6h$) pour la synthèse du composé radiopharmaceutique ainsi que pour son transport éventuel, son injection chez le patient et son analyse en imagerie.

- L'énergie des positons émis (0,64 MeV) étant plus faible que celle des autres émetteurs de positons, leur temps de parcours dans les tissus est donc très court (2-3 mm), ce qui permet d'obtenir une haute résolution en imagerie.

- Le fluor-18 peut également être produit en grandes quantités, de l'ordre de plusieurs curies, sous forme de $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ dans un cyclotron.

- Le fluor-18 est un radionucléide de choix en TEP car majoritairement émetteur de positons. (46) Certains autres émetteurs de positons émettent également des rayons gamma qui viennent perturber la détection du rayonnement gamma émis par l'annihilation d'un positon et d'un électron.

- L'introduction d'un atome de fluor à la place d'un groupement hydroxyle n'a pas beaucoup d'effet stérique, la seule modification possible serait au niveau des propriétés physico-chimiques du composé marqué dû à la plus grande électronégativité du fluor. De plus, beaucoup de molécules possédant un intérêt biologique présentent fréquemment un atome de fluor (environ 30% des molécules utilisées en thérapie). (48)

Nous avons démontré les avantages de la tomographie par émission de positons au paragraphe 1.1.2 et de l'utilisation du fluor-18 comme radionucléide dans ce paragraphe. Dans les deux chapitres suivants (1.3 et 1.4), nous nous intéresserons à deux sortes de molécules organiques : les peptides et les oligonucléotides (plus particulièrement les siRNAs) ainsi qu'aux différentes méthodes utilisées pour les marquer à l'aide du fluor-18 en vue de leur étude par tomographie par émission de positons. Ces deux types de biomolécules ont été choisis car ils sont à la base de notre travail, nous y reviendrons par la suite.

1.3 Marquage de peptides

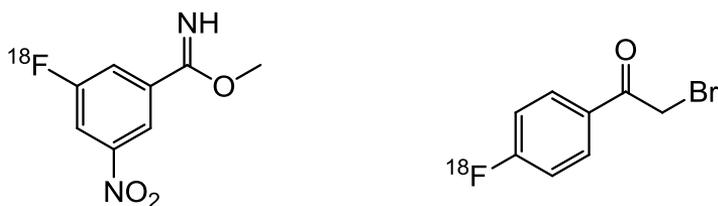
Beaucoup de publications de ces dernières années montrent que les peptides sont devenus un groupe important de ligands utilisés en médecine nucléaire aussi bien pour le diagnostic que pour la thérapie. (30, 49) Dans les tumeurs, certains récepteurs sont surexprimés, les peptides marqués se liant à ces derniers sont donc très utiles pour pouvoir visualiser ces lésions tumorales. (9)

Les petits peptides marqués sont actuellement préférés aux protéines ou aux anticorps pour des applications en imagerie médicale car ils présentent plusieurs avantages sur ces macromolécules. (15) Ils peuvent être facilement synthétisés. Ils peuvent également supporter des conditions chimiques relativement dures nécessaires à une modification de leur structure. Ils sont moins susceptibles d'induire une réponse immunogène. Ils sont vite éliminés du sang grâce à leur petite taille, possèdent une grande affinité pour les tissus-cibles et pénètrent facilement les tumeurs. (17, 49-51)

Comme l'incorporation du fluor-18 est habituellement réalisée par une substitution nucléophile sur un atome de carbone, sous des conditions très basiques et à des températures élevées, le marquage direct des peptides est fortement déconseillé car ces conditions extrêmes risqueraient de les dégrader. Même si certains groupes de recherches marquent directement les peptides (52-54), une méthode plus sûre est l'utilisation d'un groupement prosthétique porteur du fluor-18. Ce dernier est couplé à une fonction réactive située sur le peptide-cible (-NH₂, -SH, -OH ou -COOH).

1.3.1 Exemples de groupements prosthétiques

Parmi les premiers groupements prosthétiques synthétisés et porteurs d'un fluor-18, on trouve le bromure de 4-[^{18}F]fluorophenacyle et le 3-[^{18}F]fluoro-5-nitrobenzimidate (49, 55).



3-[^{18}F]fluoro-5-nitrobenzimidate bromure de 4-[^{18}F]fluorophenacyle

Fig. 18 Premiers groupements prosthétiques porteurs d'un fluor-18

Après les publications des synthèses de ces molécules, le marquage de peptides utilisant divers nouveaux groupements prosthétiques s'est rapidement développé.

Attardons-nous sur trois groupements prosthétiques plus largement utilisés : le N-[2-(4- ^{18}F -fluorobenzamido)-éthyl]-maléïmide ([^{18}F]FBEM), le N-succinimidyl 4-(^{18}F -fluorométhyl)-benzène ([^{18}F]SFB) et le [^{18}F]fluorobenzaldéhyde ([^{18}F]FBA). (32, 49, 56-59)

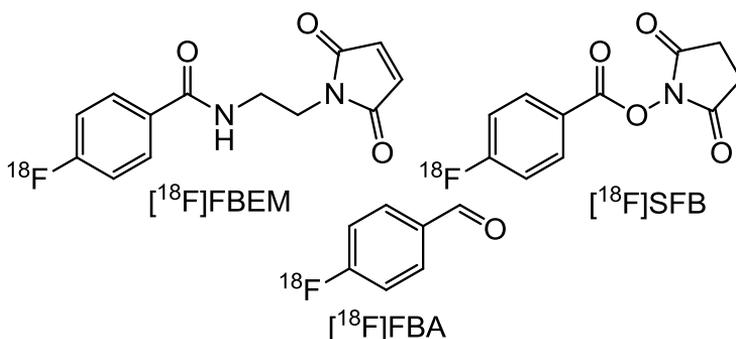


Fig. 19 Groupements prosthétiques [^{18}F]fluorés couramment utilisés

Le marquage d'un peptide peut s'effectuer, par exemple, sur une fonction thiol libre. Pour cela, des groupements prosthétiques porteurs d'un groupe maléimide sont souvent utilisés, le plus courant est le [^{18}F]FBEM. Les fonctions amines libres sont également couramment utilisées pour lier un groupement prosthétique. Le [^{18}F]SFB est largement utilisé pour réagir avec ces dernières avec de bons rendements. Il possède, de plus, une bonne stabilité *in vivo*. (57, 60) Cependant la synthèse de ce synthon implique plusieurs étapes. La radiosynthèse du [^{18}F]FBA, quant à elle, s'effectue en une seule étape. (59) Ce dernier est surtout utilisé pour marquer les lysines des peptides via une réaction d'amination réductrice ou via la formation d'oximes. (61-63) Pour pouvoir marquer le peptide à l'aide du [^{18}F]FBA via la formation d'une oxime, une fonction amine libre doit porter une fonction aminoxy comme décrit dans la figure suivante.

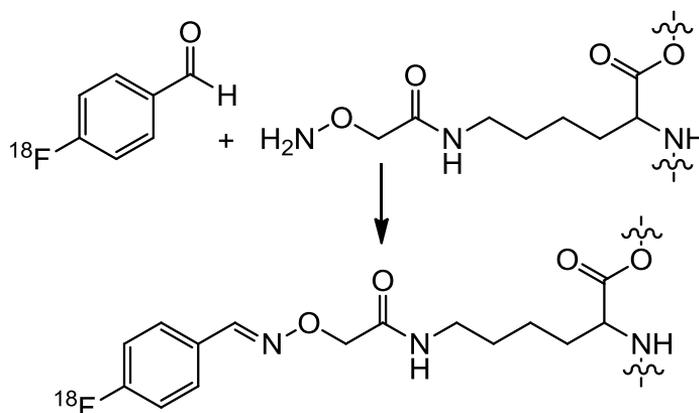


Fig. 20 Marquage d'un peptide avec le [^{18}F]FBA via la formation d'une oxime

A la place de la fonction aminoxy, une petite molécule porteuse d'un atome de silicium peut être couplée à une fonction amine libre du peptide. Grâce à la grande affinité du fluor pour le silicium, ce dernier peut y être greffé dans des conditions douces via une réaction de substitution nucléophile en utilisant un groupement partant adapté (-

Oalkyl, -OH, -H). (64-68) Un exemple est repris dans la figure suivante. L'inconvénient majeur de cette technique est l'introduction d'un groupement apolaire contenant le silicium dans une biomolécule polaire. Il n'y a d'ailleurs pas encore de peptides marqués de la sorte utilisés dans un but clinique.

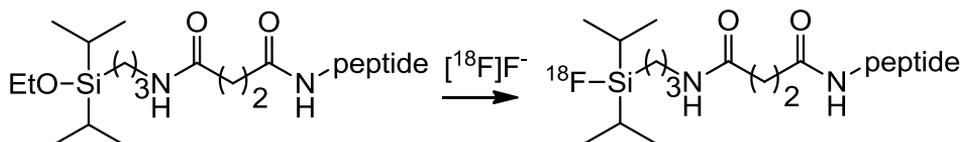


Fig. 21 Marquage d'un peptide via un atome de silicium (65)

1.3.2 Méthodes de liaison

Plusieurs méthodes de liaison ont été étudiées : acylation, amidation, imidation, alkylation, photochimie,... (32, 49, 56, 69-72) Les tables 4 et 5 reprennent une liste non exhaustive des différentes méthodes. La table 4 montre différentes techniques de liaison entre un acide aminé et un groupe prosthétique ^{18}F fluoré. La table 5 reprend quelques techniques de liaison entre une fonction préalablement introduite sur un peptide et un groupement prosthétique ^{18}F fluoré.

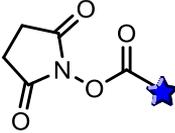
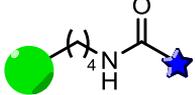
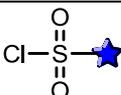
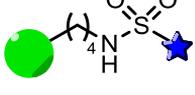
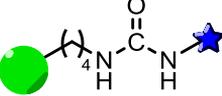
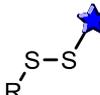
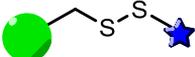
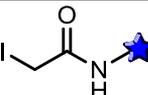
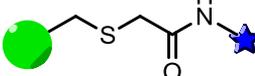
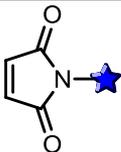
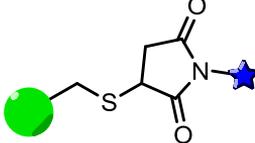
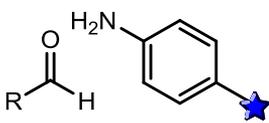
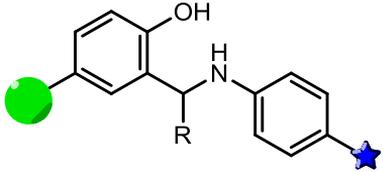
Acide aminé	Groupe prosthétique [¹⁸ F]fluoré	Produit du couplage
Lys		
Lys		
Lys		
Cys		
Cys		
Cys		
Tyr		

Table 4 Marquage de peptide par un groupement prosthétique [¹⁸F]fluoré via une fonction naturellement présente sur un acide aminé

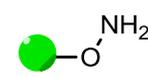
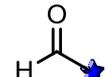
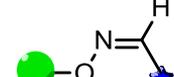
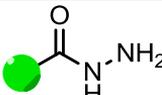
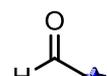
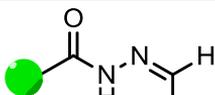
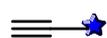
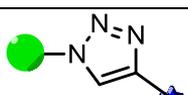
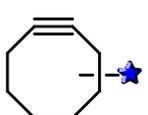
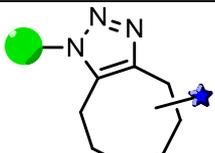
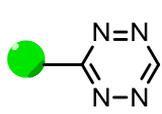
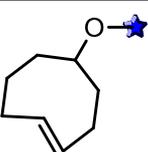
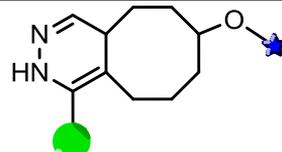
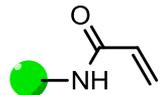
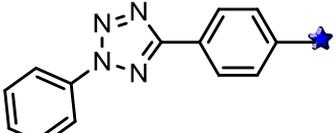
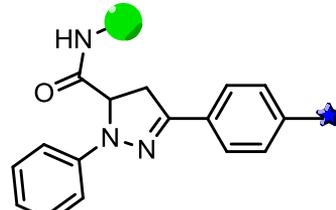
	Fonction introduite sur le peptide	Groupe prosthétique [¹⁸ F]fluoré	Produit du couplage
1			
2			
3			
4			
5			
6			

Table 5 Marquage de peptide par un groupement prosthétique [¹⁸F]fluoré via une fonction introduite, non naturelle. 1 : formation d'oxime. 2 : Formation d'hydrazone.

3 : Chimie click : cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen (inversion possible de l'azoture et de l'alcyne). 4 : Chimie click : utilisation d'un cyclooctyne. 5 : Réaction entre une tétrazine et un transcyclooctène. 6 : Photoclick.

Une autre technique est également utilisée, celle d'incorporer, pendant la synthèse peptidique, un acide aminé non naturel. Prenons comme exemple l'utilisation de la p-iodophénylalanine. Celle-ci peut être convertie en une p-éthynylphénylalanine via une réaction de Sonogashira. (Fig. 22) L'alcyne terminal peut alors être couplé à un groupement prosthétique possédant une fonction azoture via une réaction de chimie click. (73, 74)

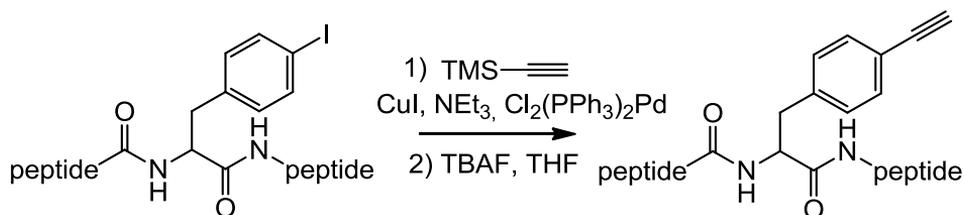


Fig. 22 Réaction de Sonogashira sur une p-iodophénylalanine présente dans un peptide

La plupart des méthodes présentées ci-dessus ont le désavantage de nécessiter un peptide préalablement modifié. L'utilisation de fonctions naturellement présentes sur les acides aminés est plus facile à mettre en œuvre.

Les lysines et les cystéines sont les acides aminés les plus couramment utilisés dans un couplage avec un groupement prosthétique. Cependant, la lysine étant un acide aminé très présent dans les peptides ou les protéines, il est difficile de cibler exactement l'endroit de la modification. Les cystéines sont, quant à elles, plus rares et couramment présentes sous la forme de ponts disulfures dans leur environnement naturel, ce qui les rend peu disponibles. Pour pouvoir contourner ces problèmes, le groupement prosthétique porteur du fluor-18 pourrait se lier à des acides aminés peu présents sur la surface des protéines, comme par exemple les tyrosines ou les tryptophanes. Nous y reviendrons dans le but du travail.

1.4 Marquage de siRNA

L'autre type de biomolécule auquel nous consacrons une partie de ce travail sont les oligonucléotides et plus particulièrement les siRNAs (small interfering RNA). Les siRNAs sont une classe de macromolécules constituées par association de deux brins d'ARN de courte séquence (\pm 21 nucléotides). (Fig. 23) (75)

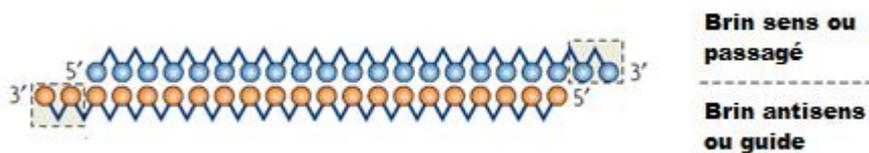


Fig. 23 Structure d'un siRNA (76)

Comme les peptides et les protéines, les oligonucléotides et les siRNA sont également des agents thérapeutiques très prometteurs. Ils ont la capacité d'inhiber des gènes qui seraient à l'origine de certaines maladies. (75-81). Les explications de ces deux mécanismes (utilisation d'oligonucléotides ou de siRNAs) sont données dans les paragraphes suivants.

1.4.1 Utilisation d'oligonucléotides comme agents thérapeutiques

Un oligonucléotide antisens est un court oligonucléotide possédant une séquence complémentaire et pouvant se lier à un ARN-cible et, dès lors, inhiber sa traduction comme expliqué dans la figure 24.

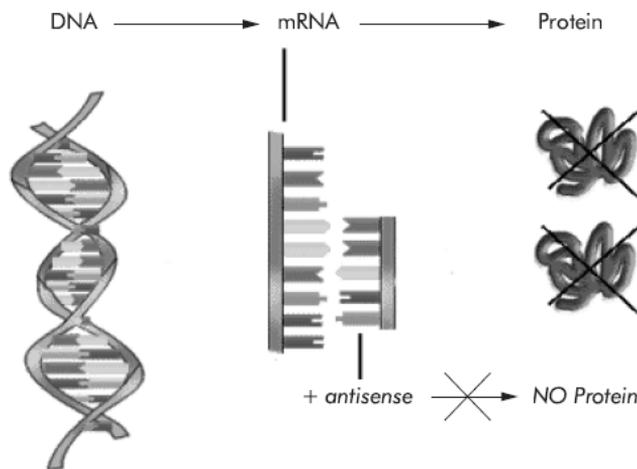


Fig. 24 Mécanisme d'action d'un oligonucléotide antisens (78)

1.4.2 Utilisation de siRNAs comme agents thérapeutiques

Le mécanisme d'action du processus ARN interférence, responsable de la formation de siRNA est expliqué dans la figure 25. Le long ARN double brin (dsRNA) est rompu, par une enzyme nommée Dicer, en petits siRNAs. Ces siRNAs sont incorporés dans un complexe enzymatique RISC (RNA-induced silencing complex) dans lequel les deux brins sont séparés. Le complexe RISC contenant le brin sens ou le brin antisens recherche et se lie à une séquence ARN complémentaire. Le brin d'ARN est alors dégradé.

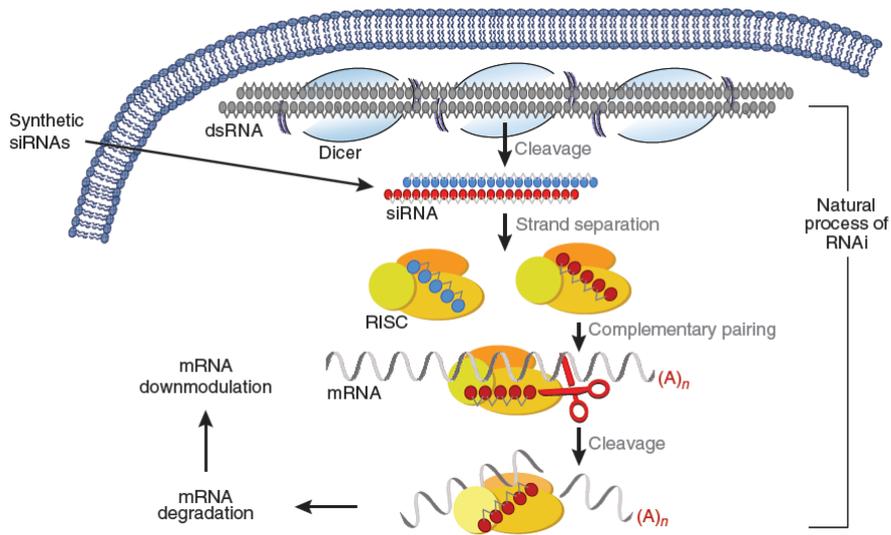


Fig. 25 Mécanisme cellulaire d'ARN interférence (79)

1.4.3 Stabilité des oligonucléotides et des siRNAs

Divers oligonucléotides et siRNAs peuvent donc être synthétisés en laboratoire et être utilisés comme agents thérapeutiques en inhibant l'expression de certains gènes. Cependant, les oligonucléotides naturels (phosphodiesters) subissent une dégradation rapide par des enzymes plasmatiques et passent difficilement la membrane cellulaire. (78, 82) Pour leur conférer une résistance contre les nucléases, trois modifications peuvent être faites : une liaison phosphorothioate entre chaque sucre, une méthylation en position 2' des riboses dans les ARNs ou une alternance entre un lien phosphodiester classique et un lien méthylphosphonate. Ces modifications sont reprises dans la figure 26.

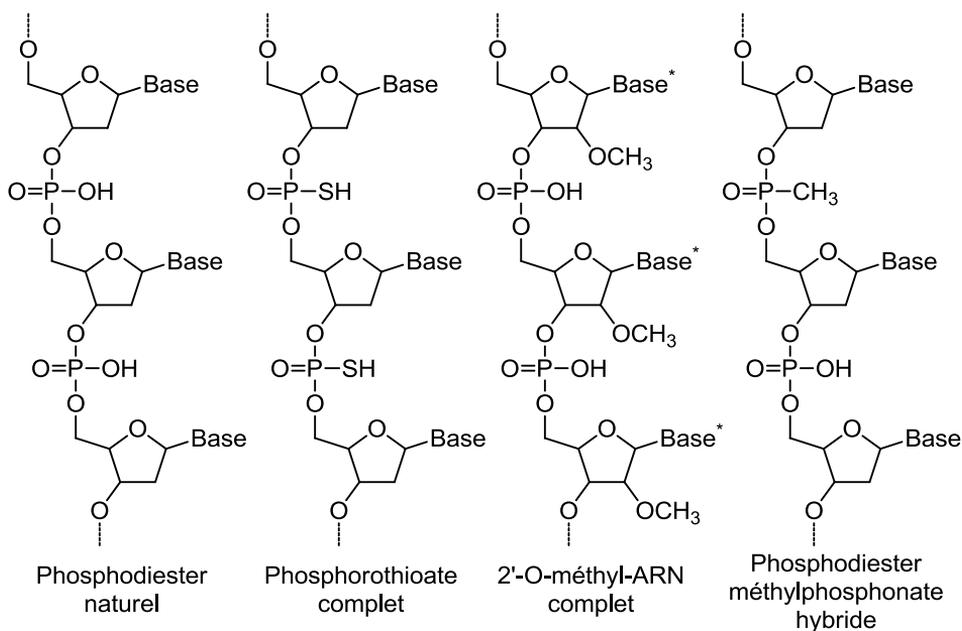


Fig. 26 ADN phosphodiester naturel et oligonucléotides modifiés. Base : A (Adénine), C (Cytosine), G (Guanine), T (Thymine). * Thymine est remplacée par U (Uracile) (83)

Pour vérifier que le siRNA atteint correctement sa cible, la tomographie par émission de positons et le marquage de l'oligonucléotide ou du siRNA au fluor-18 semble être une excellente méthode. Les avantages de cette méthode et du fluor-18 sont largement décrits dans les paragraphes 1.1.2 et 1.2.3.2.3.

1.4.4 Techniques de marquage des oligonucléotides et des siRNAs

Pour ces marquages, les problèmes rencontrés précédemment sont toujours présents. Les conditions de réaction pour l'introduction directe d'un fluor-18 sur un oligonucléotide ou un siRNA détruiraient cette biomolécule. Dès lors, la méthode qui semble, dans ce cas-ci aussi, la plus adéquate est l'utilisation d'un groupement prosthétique porteur d'un

fluor-18 suivi de son couplage à l'oligonucléotide ou au siRNA via une fonction réactive préalablement introduite sur ces derniers.

Plusieurs méthodes utilisant cette technique ont déjà été décrites dans la littérature : par exemple sur une chaîne alkyle greffée sur l'oligonucléotide et possédant une amine terminale, via une acylation en utilisant le succinimido 4- ^{18}F fluorobenzoate (^{18}F SFB) (84), via formation de thiourée en liant l'isothiocyanate de 4- (^{18}F fluorométhyl)phényle (^{18}F FMPI) (85) ou via une réaction photochimique en utilisant le ^{18}F fluorure de 3-azido-5-nitrobenzyle (^{18}F ANBF) (86).

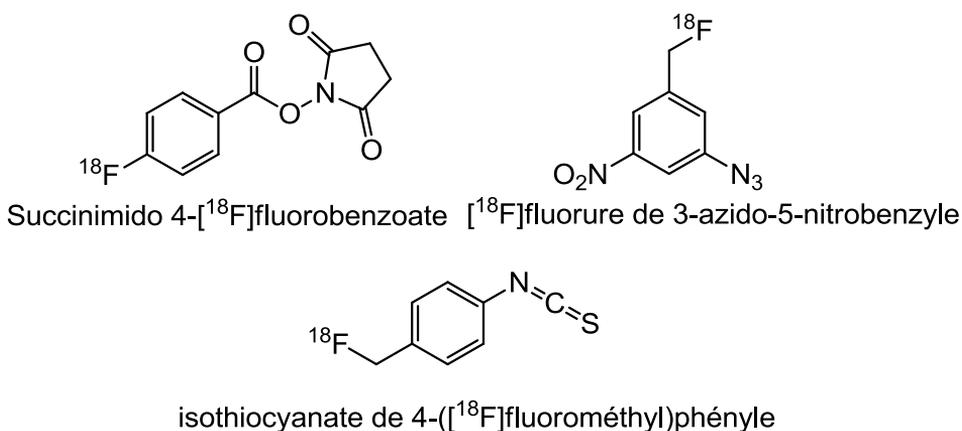


Fig. 27 Groupements prosthétiques porteurs d'un fluor-18 et couplés avec un oligonucléotide via une chaîne hexylamine

Un autre exemple est le marquage d'oligonucléotides via une alkylation en utilisant sur un oligonucléotide porteur d'un groupe phosphorothioate à son extrémité 3' ou 5' soit le N- ^{18}F (4-fluorobenzyl)-2-bromoacétamide (^{18}F FBBA) (78, 83, 87-89), soit le 2-bromo-N-[3-(2- ^{18}F fluoropyridine-3-yloxy)propyl]acétamide (^{18}F FPyBrA). (32, 90, 91) Ces deux groupements prosthétiques ont été couplés à divers oligonucléotides.

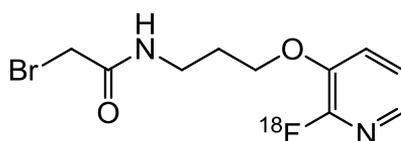
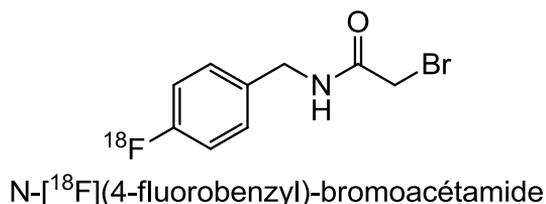


Fig. 28 Groupements prosthétiques porteurs d'un fluor-18 et couplés avec un oligonucléotide via un groupe phosphorothioate en position 3' ou 5'

Le marquage des siRNAs s'effectue de la même manière que celui des oligonucléotides. Dans ce cas, le marquage s'effectue sur un des deux brins avant ou après la formation du duplex (l'anncaling). Des études ont démontré la meilleure stabilité *in vivo* d'un siRNA modifié en son extrémité 3' en comparaison avec ceux modifiés en leur extrémité 5'. (92, 93) La modification en position 3' permet de limiter le risque de dégradation par les 3'-exonucléases et d'éviter l'altération des propriétés du siRNA.

Le groupement prosthétique précédemment cité, le [¹⁸F]FPyBrA, a d'ailleurs été utilisé dans ce domaine. (94, 95) Dans ces études, un des deux brins du siRNA porteur à son extrémité 3' d'un phosphorothioate est marqué avec le [¹⁸F]FPyBrA, l'anncaling est ensuite réalisé.

Une méthode, récemment étudiée dans notre laboratoire, pour introduire un groupement prosthétique [¹⁸F]fluoré sur le siRNA est la chimie click et plus précisément la cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen. (96) Le groupement prosthétique est porteur d'un groupement azoture et l'oligonucléotide est porteur d'un groupement alcyne. (Fig. 29)

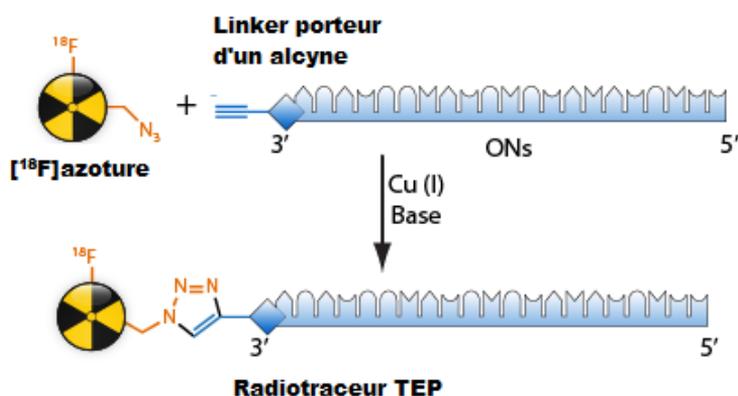


Fig. 29 Couplage entre un groupement prosthétique et un oligonucleotide modifié via une réaction de cycloaddition de Huisgen. On = oligonucléotide

Cette méthode a déjà été utilisée sur une large gamme de biomolécules aussi bien en chimie froide qu'en radiochimie. (97-104) Cette réaction, nécessitant du Cu(I), s'effectue dans des conditions aqueuses douces et ne nécessite pas de protection préalable des autres fonctions chimiques présentes sur le composé organique. Dans notre cas, ces conditions de réaction n'affecteront donc pas la stabilité du siRNA. Le choix de cette stratégie permet donc de réaliser la réaction de couplage entre le siRNA et le groupement prosthétique [^{18}F]fluoré après la formation du double brin contrairement aux études déjà réalisées par Viel et son équipe. (94, 95)

La méthode idéale pour le marquage de siRNA est donc l'introduction d'un linker porteur d'une fonction alcyne, permettant la réaction de chimie click, à l'extrémité 3' du siRNA. La synthèse des siRNAs s'effectuant de l'extrémité 3' à l'extrémité 5', un support solide porteur du linker peut être synthétisé et utilisé au départ d'une synthèse de siRNA. Shiraishi et son équipe ont déjà développé un linker permettant d'utiliser cette stratégie. (Fig. 30) (105)

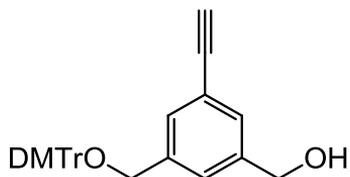


Fig. 30 Linker développé par Shiraishi et son équipe

Un autre linker respectant ces différentes conditions a été synthétisé dans notre laboratoire, le (2R)-O-(4,4-diméthoxytrityl)-N-propargyl-2,4-dihydroxybutyramide. (Fig. 31) (96, 97)

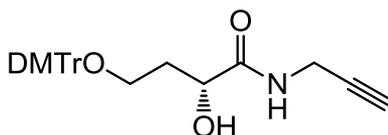


Fig. 31 (2R)-O-(4,4-diméthoxytrityl)-N-propargyl-2,4-dihydroxybutyramide

Le choix de la structure du linker est très important. Lors de ce travail, nous avons défini plusieurs critères structuraux essentiels. Nous y revenons dans la partie « Résultats et discussion » de ce travail.

2 *But du travail*

Le but de ce travail est de développer de nouvelles méthodes de marquage de biomolécules à l'aide d'un fluor-18 applicable aux peptides et aux siRNAs et ce, en vue d'études futures par tomographie par émission de positons.

La première partie de ce travail concerne spécifiquement le marquage de peptides. Comme expliqué dans les paragraphes précédents, le marquage direct sur un peptide n'est pas idéal. L'utilisation de groupes prosthétiques est donc la meilleure solution pour y introduire un atome de fluor-18. Mais le couplage de ces groupes sur la fonction amine de la lysine ou la fonction thiol de la cystéine n'est pas le meilleur choix à cause de l'abondance de la première et de la formation de ponts di-sulfures de l'autre. Notre attention s'est donc tournée vers le marquage d'un autre acide aminé : la tyrosine. Celles-ci sont moins abondantes et par conséquent, leur marquage est beaucoup plus spécifique. Un nouveau groupement prosthétique [¹⁸F]fluoré et réagissant spécifiquement avec les tyrosines sera donc synthétisé et testé.

La deuxième partie de ce travail consiste en la synthèse de linkers permettant de relier un groupement prosthétique porteur d'un fluor-18 à un siRNA. Pour ce faire, nous utiliserons la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen pour ses conditions de réactions très douces comme expliqué dans le chapitre précédent. Le groupement prosthétique [¹⁸F]fluoré choisi est un composé porteur d'un azoture. Ce composé est couramment produit dans notre laboratoire et sa synthèse reproductible donne de bons rendements. La réaction de click implique par conséquent une modification du siRNA en y introduisant une fonction alcyne. Cette

fonction sera portée par un linker répondant à certains critères définis et expliqués dans la partie « Résultats et discussions ».

Au cours de ce travail, deux linkers différents seront synthétisés. Ceux-ci, via une réaction sur support solide, permettront de synthétiser le siRNA. Ensuite ce siRNA, libre du support solide, sera couplé au groupement prosthétique [^{18}F]fluoré.

3 Résultats et discussions

3.1 Marquage de tyrosine

Le but de cette partie du travail est de marquer spécifiquement une tyrosine présente dans un peptide. L'avantage de marquer une tyrosine (au lieu d'un autre acide aminé) via un groupement prosthétique [^{18}F]fluoré (au lieu d'un radioisotope iodé) a été expliqué dans la partie introductive de ce travail. Pour ce faire, un nouveau groupement prosthétique [^{18}F]fluoré va être développé.

Parmi les différentes techniques décrites dans la littérature pour le greffage d'un groupe prosthétique sur une tyrosine, l'approche d'Hitoshi Ban et son équipe a retenu plus particulièrement notre attention. Elle consiste à faire réagir une tyrosine avec le 4-phényl-3*H*-1,2,4-triazoline-3,5(4*H*)-dione (PTAD). (Fig. 32) (106, 107) Le groupement PTAD a l'avantage de réagir spécifiquement avec les tyrosines et cette réaction s'effectue dans des conditions douces, indispensables lors de l'utilisation de peptides ou de protéines.

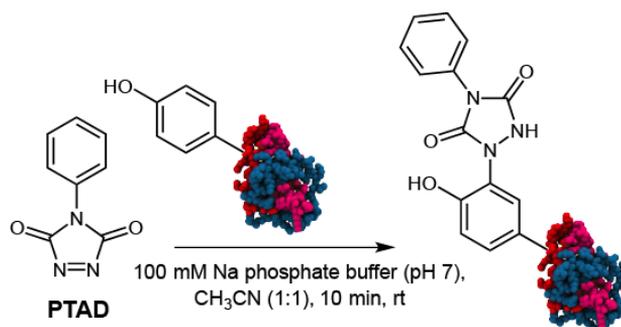


Fig. 32 Couplage entre PTAD et tyrosine

Pour utiliser cette approche et marquer une tyrosine, le fluor-18 est introduit sur le composé PTAD. Avant de démarrer la préparation d'un précurseur nécessaire à cette synthèse, la réaction de couplage a été

préalablement testée en utilisant comme réactif le 4-(4-fluorophényl)-3*H*-1,2,4-triazole-3,5(4*H*)-dione (F-PTAD). Nous avons effectué cette réaction dans les mêmes conditions que celles décrites par Ban et al., en 2010, en faisant réagir le F-PTAD **1** avec la N-acétyl tyrosine méthylamide **2**. (Fig. 33) (106)

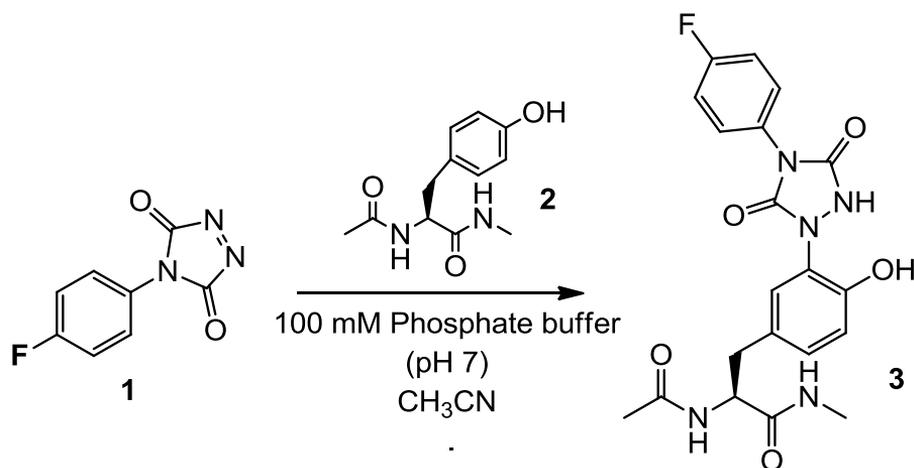
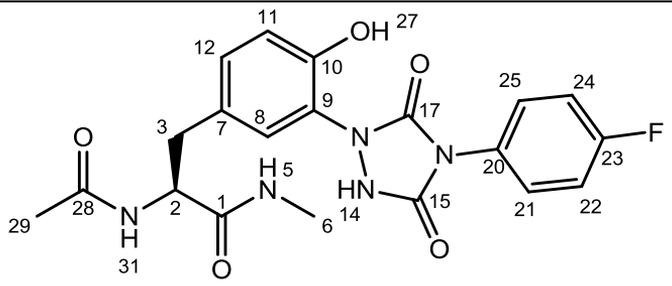


Fig. 33 Réaction entre le F-PTAD [1] et la N-acétyl tyrosine méthylamide 2

Cette réaction a été réalisée dans un mélange à volume égal de tampon phosphate 100 mM à pH 7 et d'acétonitrile en mélangeant pendant 30 minutes les deux réactifs commercialement disponibles. La réaction est suivie par HPLC et le produit final, purifié sur colonne de silice est obtenu avec un rendement de 60%. Une analyse RMN du (S)-2-acétamido-3-(4-hydroxy-3-(4-(4-fluorophényl)-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidin-1-yl)phényl)-N-méthylpropanamide **3** est proposée dans la table 6.

Résultats et discussions

						
¹ H	δ(ppm)	Multiplicité	Intégration	J (Hz)	¹³ C	δ(ppm)
2	4,28-4,34	multiplet	1	4, 4 et 8	1	171,7
3a	2,61-2,66	douplet de doublet	1	8 et 12	2	54,6
3b	2,83-2,87	douplet de doublet	1	4 et 12	3	37,3
5	7,96-7,97	douplet	1	4	6	25,5
6	2,54-2,55	douplet	3	4	7	130,6
8	7,70	singulet	1		8	121,6
11	6,69-6,71	douplet	1	8	9	153,0
12	6,84-6,86	douplet	1	8	10	149,8
21 et 25	7,57-7,60	douplet de doublet	2	4 (H-F) et 8 (H-H)	11	117,2
22 et 24	7,25-7,29	triplet	2	8 (H-H et H-F)	12	125,1
29	1,77	singulet	3		15	161,3
31	8,16-8,17	douplet	1	4	17	166,2
					20	128,2
					21 et 25	127,5- 127,6 J=9Hz
					22 et 24	115,0- 115,2

	J=23Hz
23	159,0- 161,3 J=236Hz (C-F)
28	169,1
29	22,7

Table 6 Attribution RMN du (S)-2-acétamido-3-(4-hydroxy-3-(4-(4-hydroxyphényl)-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidin-1-yl)phényl)-N-méthylpropanamide 3

Cette réaction donnant des rendements acceptables (50%), la synthèse d'un analogue au composé PTAD porteur d'un fluor-18 a été entreprise.

Deux stratégies différentes s'offrent à nous pour synthétiser le [^{18}F]F-PTAD **1**. Soit le marquage est réalisé en dernière étape sur un précurseur analogue au PTAD contenant un bon groupe partant, soit le fluor-18 est introduit au début de la synthèse et toutes les étapes suivantes de la préparation du [^{18}F]F-PTAD sont réalisées en radiochimie. (Fig. 34)

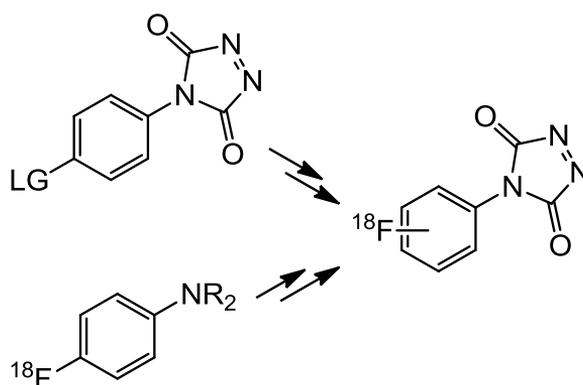


Fig. 34 Deux stratégies possibles pour obtenir le [^{18}F]F-PTAD. LG = groupe partant.

Pour éviter l'exposition prolongée de l'opérateur à la radioactivité, nous avons préféré, dans un premier temps, la première voie de synthèse.

3.1.1 Synthèse et marquage d'un précurseur analogue au PTAD

3.1.1.1 Synthèse de précurseurs aromatiques

3.1.1.1.1 4-(4-nitrophényl)-3H-1,2,4-triazole-3,5(4H)-dione

Notre première approche fut de synthétiser le 4-(4-nitrophényl)-3H-1,2,4-triazole-3,5(4H)-dione, analogue nitré du composé PTAD. (Fig. 35)

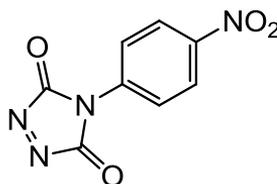


Fig. 35 4-(4-nitrophényl)-3H-1,2,4-triazole-3,5(4H)-dione

Le marquage de ce composé semble, à première vue, difficile car les conditions requises pour une substitution nucléophile aromatique ne sont pas toutes remplies. Le groupe nitro est un bon groupe partant mais il ne possède pas de groupe électroattracteur en position para. Pour nous en assurer, et ne pas passer à côté de la solution la plus facile, le marquage du composé nitré a quand même été testé, d'autant plus que la synthèse du précurseur était facile à mettre en œuvre.

Le précurseur et la référence froide ont été synthétisés selon un même schéma de synthèse représenté dans la figure 36.

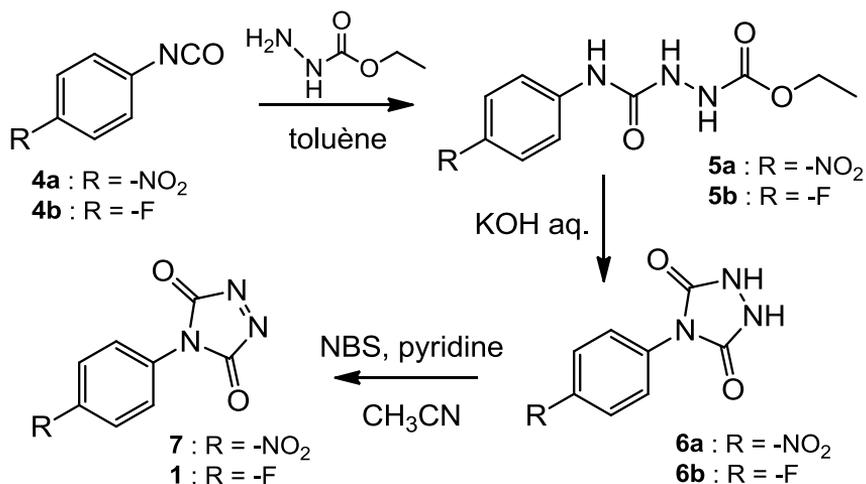


Fig. 36 Synthèse des précurseurs analogues au composé PTAD

La première étape de la synthèse a impliqué le couplage entre l'isocyanate **4** et le carbazate d'éthyle pour donner le semicarbazide **5** correspondant. (108-110) Ensuite, la cyclisation du semicarbazide **5** a été réalisée en milieu fortement basique comme décrit par Cookson et son équipe. (111) Et enfin, le cycle triazolidine du composé **6** a été oxydé pour obtenir l'analogue PTAD désiré **1** ou **7**. L'oxydation est quasi immédiate et se remarque par un très fort changement de coloration du milieu, la solution se colore en rouge intense. Plusieurs conditions de réaction pour l'oxydation ont été testées et sont décrites dans la table 7.

Conditions de réaction	Coloration	Littérature
N-bromosuccinimide / Pyridine	Rouge	Ban et al. (106)
Ca(OCl) ₂ / CH ₃ CN	Rouge	Zolfigol et al. (112)
Acide Périodique ou Oxone / KBr	Rouge	Zolfigol et al. (113)
NaHSO ₄ / NH ₄ NO ₃	Aucune réaction	Ghorbani et al. (114)

Table 7 Conditions pour la réaction d'oxydation du cycle triazolidine

Les semicarbazides **5** et les composés portant le cycle triazolidine **6** ont été récupérés très facilement par filtration en fin de réaction. Par contre, les composés porteurs du cycle triazole n'ont pas pu être isolés et donc caractérisés. Ces composés sont très instables, ils se décomposent au contact de la lumière, de la chaleur, des nucléophiles,.... (113) Les résultats RMN de ces différents composés sont regroupés dans les tables 8 à 11.

¹ H	δ(ppm)	Multiplicité	Intégration	J (Hz)	¹³ C	δ(ppm)
1 et 3	8,16-8,18	douplet	2	8	1 et 3	125,0
4 et 6	7,74-7,76	douplet	2	8	2	141,1
7	8,39	singulet (large)	1		4 et 6	117,7
10	9,52	singulet (large)	1		5	146,5
11	9,04	singulet (large)	1		8	155,1
15	4,03-4,11	quadruplet	2	7,5	12	156,9
16	1,17-1,23	triplet	3	7,5	15	60,7
					16	14,6

Table 8 Attribution RMN du *p*-nitro-4-phényl-1-carboéthoxysemicarbazide **5a**

¹ H	δ(ppm)	Multiplicité	Intégration	J (Hz)	¹³ C	δ(ppm)
1 et 3	7,04-7,11	triplet	2	8 (H-H et H-F)	1 et 3	115,4-115,6 J=22Hz
4 et 6	7,44-7,50	doublet de doublet	2	4 (H-F) et 8 (H-H)	2	156,6-159,0 J=237Hz
7	8,02	singulet (large)	1		4 et 6	136,5
10	8,76	singulet (large)	1		5	120,7
11	8,91	singulet (large)	1		8	156,2
15	4,01-4,10	quadruplet	2	7,5	12	157,4
16	1,16-1,22	triplet	3	7,5	15	61,0
					16	15,1

Table 9 Attribution RMN du *p*-nitro-4-fluoro-1-carbéthoxysemicarbazide 5b

Les singulets des trois protons portés par les atomes d'azote sont des pics assez larges et il n'y a pas de couplage entre eux, même entre les protons 10 et 11. Ceci est dû à la capacité de ces protons à être échangeables. Les déplacements chimiques des amines 7, 10 et 11, ont été attribués en fonction de l'environnement chimique de chaque proton.

(115)

Résultats et discussions

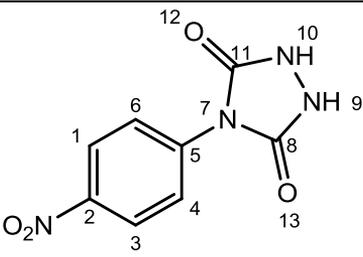
						
¹ H	δ(ppm)	Multiplicité	Intégration	J (Hz)	¹³ C	δ(ppm)
1 et 3	8,33-8,35	doublet	2	8	1 et 3	124,1
4 et 6	7,88-7,90	doublet	2	8	2	145,5
9 et 10	10,80	singulet (large)	2		4 et 6	125,5
					5	138,1
					8 et 11	152,3

Table 10 Attribution RMN du 4-(4-nitrophényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione 6a

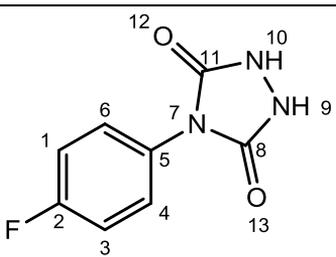
						
¹ H	δ(ppm)	Multiplicité	Intégration	J (Hz)	¹³ C	δ(ppm)
1 et 3	7,36-7,40	triplet	2	8 (H-F et H-H)	1 et 3	116,0- 116,2 J=22Hz
4 et 6	7,54-7,58	doublet de doublet	2	4 (H-F) et 8 (H-H)	2	160,2- 162,6 J=243Hz
9 et 10	10,50	singulet	2		4 et 6	128,7
					5	140,2
					8 et 11	153,7

Table 11 Attribution RMN du 4-(4-fluorophényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione 6b

3.1.1.1.2 4-(4-nitrophényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione

Le 4-(4-nitrophényl)-3*H*-1,2,4-triazole-3,5(4*H*)-dione **7** (PTAD-NO₂) n'ayant pas pu être isolé à cause de son instabilité, le marquage ne pourra donc pas être réalisé sur ce dernier. Nous décidons néanmoins de tester le marquage sur le 4-(4-nitrophényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione, composé porteur du cycle triazolidine **6a**. (Fig. 37)

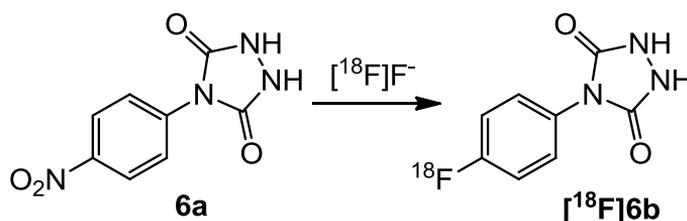


Fig. 37 Marquage du 4-(4-nitrophényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione **6a**

Agent de fluoration	Zone de température	Temps de marquage
Conditions classiques : KF[¹⁸ F]-K ₂₂₂ /K ₂ CO ₃	Varie de 90 à 180°C	Varie de 5 à 25 min
CH ₃ (CH ₂) ₁₃ N ⁺ Me ₃ [¹⁸ F] (116)		
Phosphazène (P ₂ Et) (117)		

Table 12 Essais de marquage de 4-(4-nitrophényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione **6a**

Malgré plusieurs essais réalisés en variant l'agent de fluoration, la température et la durée du marquage (Table 12), le composé [¹⁸F]fluoré désiré n'a jamais été obtenu.

Pour s'assurer que ce ne sont pas les protons libres qui empêchent le marquage, le cycle triazolidine du 4-(4-nitrophényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione **6a** a été protégé par deux groupes *tert*-butoxycarbonyle (Boc). (Fig. 38) La référence fluorée **8b** a également été synthétisée.

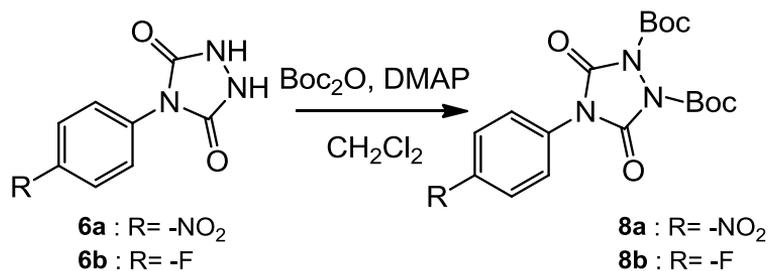


Fig. 38 Protection du cycle triazolidine par deux groupements Boc

¹ H	δ(ppm)	Multiplicité	Intégration	J (Hz)	¹³ C	δ(ppm)
1 et 3	8,34-8,36	doublet	2	8	1 et 3	124,8
4 et 6	7,79-7,81	doublet	2	8	2	147,1
16-18 et 23-25	1,53	singulet	18		4 et 6	126,0
					5	136,8
					8 et 11	150,2
					15 et 22	87,3
					16 à 18 et 23 à 25	27,2
					19 et 26	154,1

Table 13 Attribution RMN du 4-(4-nitrophényl)-1,2-di-tert-butoxycarbonyl-1,2,4-triazolidine-3,5-dione **8a**

Résultats et discussions

¹ H	δ(ppm)	Multiplicité	Intégration	J (Hz)	¹³ C	δ(ppm)
1 et 3	7,17-7,22	triplet	2	8 (H-H) et (C-H)	1 et 3	116,3- 116,5 J=23 Hz
4 et 6	7,45-7,48	douplet de douplet	2	4 (H-F) et 8 (H-H)	2	161,2- 163,7 J= 248 Hz
16-18 et 23-25	1,62	singulet	18		4 et 6	128,0- 128,1 J=8 Hz
					5	125,8
					8 et 11	146,2
					15 et 22	87,1
					16 à 18 et 23 à 25	27,8
					19 et 26	146,6

Table 14 Attribution RMN du 4-(4-fluorophényl)-1,2-di-tert-butoxycarbonyl-1,2,4-triazolidine-3,5-dione 8b

Des tests de marquage ont été effectués sur le 4-(4-nitrophényl)-1,2-di-tert-butoxycarbonyl-1,2,4-triazolidine-3,5-dione **8a** en utilisant le DMSO comme solvant. Plusieurs conditions ont été testées en variant l'agent de fluoration, la durée, la température et la quantité de précurseur. (Table 15) La présence du composé marqué a été déterminée par TLC. Le R_f de la référence froide étant de 0,75 (éluant 100% MeOH) et celui des [^{18}F]fluorures est de 0.

Méthode de marquage	Quantité de précurseur	Temps	Température	CCM (R_f)
$\text{KF}[^{18}\text{F}]\text{-K}_{222}/\text{K}_2\text{CO}_3$	De 7 à 15 mg	De 5 à 15 min	De 100 à 180°C	0
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{N}^+\text{Me}_3[^{18}\text{F}^-]$ (116)	20 mg	15 min	De 120 à 160°C	0
Phosphazène (P_2Et) (117)	5	15 min	140 °C	0,73 (16%)
	10			0,74 (21%)
	15	15 min	120°C	0,76 (23%)
			140°C	0,8 (85%)
			160°C	0,8 (90%)

Table 15 Essais de marquage du 4-(4-nitrophényl)-1,2-di-tert-butoxycarbonyl-1,2,4-triazolidine-3,5-dione **8a**

Les résultats obtenus avec les phosphazènes comme agent de fluoration sont encourageants mais une confirmation par UPLC est nécessaire. L'UPLC a été utilisée car le précurseur et le composé marqué ont des temps de rétention relativement semblables en HPLC.

Malheureusement, nous avons constaté, comme représenté sur les chromatogrammes suivants, que le composé [^{18}F]fluoré obtenu ne correspondait pas à notre référence froide. (Fig. 39)

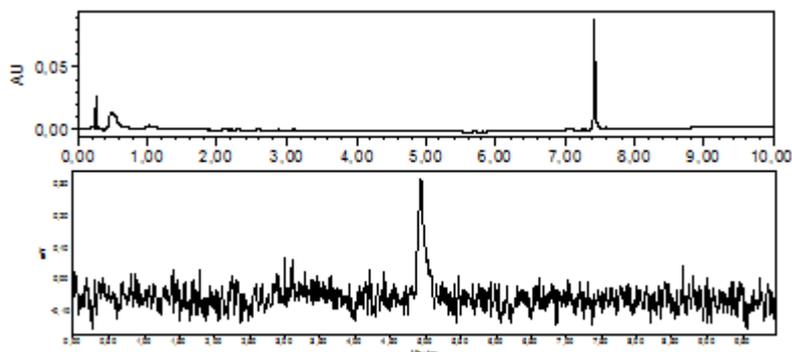


Fig. 39 Analyses UPLC. Au dessus : référence froide. En dessous : Composé [^{18}F]fluoré obtenu

Un test de stabilité sur le précurseur a été effectué, celui-ci a été placé dans les mêmes conditions que celles des marquages via les phosphazènes et nous avons effectivement remarqué une dégradation du composé en UPLC.

3.1.1.1.3 *4-(1,2-bis(tert-butoxycarbonyl)-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidin-4-yl)-N,N,N-triméthylbenzenammonium trifluoromethanesulfonate*

La synthèse de 4-(1,2-bis(tert-butoxycarbonyl)-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidin-4-yl)-N,N,N-triméthylbenzenammonium trifluorométhanesulfonate **13** a également été tentée. Dans ce composé, le groupement nitro a été remplacé par un ammonium quaternaire. Comme décrite dans la figure 40, les trois premières étapes sont identiques à celles rencontrées dans les synthèses précédentes (Fig. 36 et Fig. 38). La dernière étape est la quaternisation du groupement diméthylamine est réalisée.

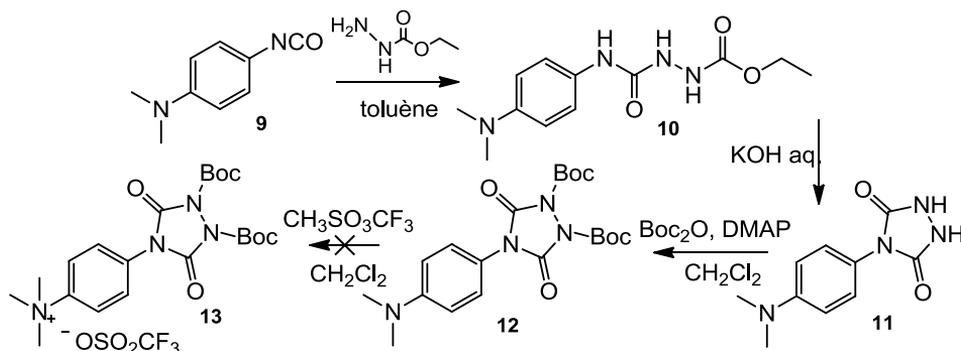


Fig. 40 Essai de synthèse du 4-(1,2-bis(tert-butoxycarbonyl)-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidin-4-yl)-N,N,N-triméthylbenzenaminium trifluoromethanesulfonate **13**

Cette dernière étape mène à plusieurs produits secondaires dans lesquels un seul ou les deux groupements Boc ont été remplacés par des groupements méthyles. Le composé **13** ne peut donc pas être obtenu et cette voie de synthèse a donc été également abandonnée.

3.1.1.2 Synthèse d'un précurseur aliphatique

Synthèse du 4-(4-(2-tosyloxyéthoxy)phényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione

Les marquages réalisés sur le 4-(4-nitrophényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione **6a** et sur ses dérivés étant infructueux, nous avons décidé de synthétiser un précurseur possédant une chaîne aliphatique à la place du groupement nitro, le 4-(4-(2-tosyloxyéthoxy)phényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione **19**. Cette alternative permet toujours d'introduire l'atome de fluor-18 en fin de synthèse et donc de minimiser l'exposition de l'opérateur. Son schéma de synthèse est illustré dans la figure 41.

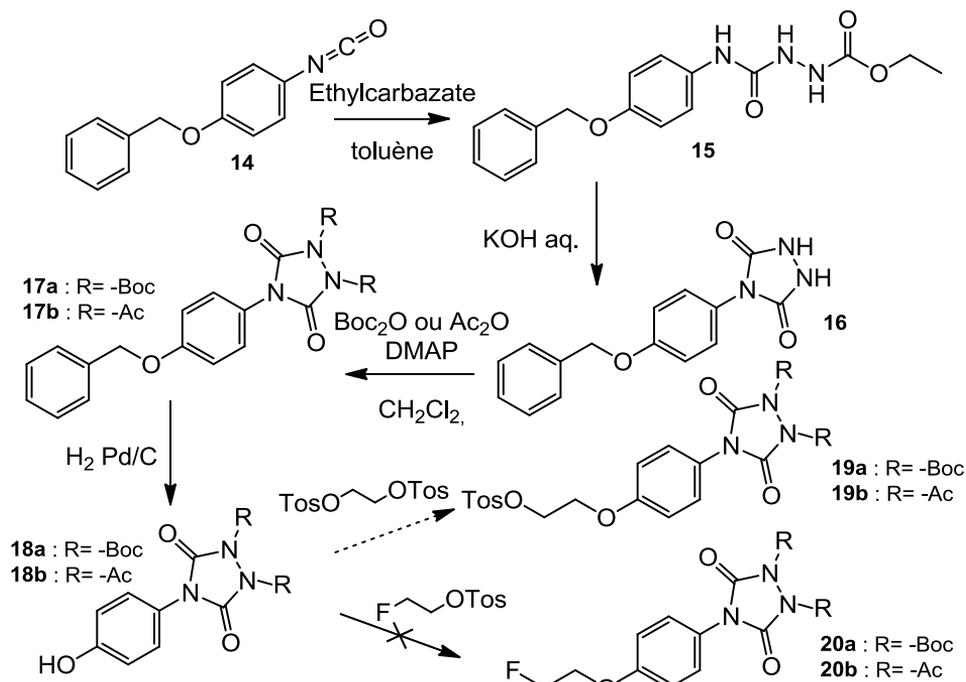
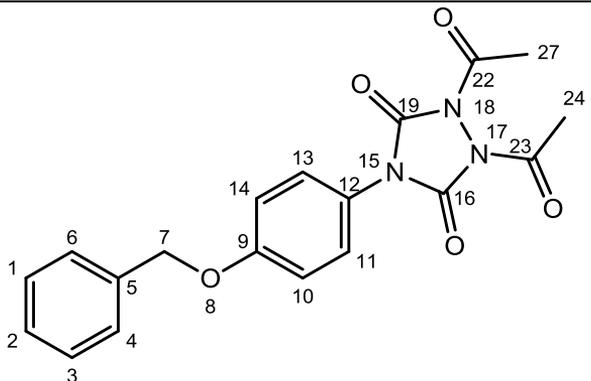


Fig. 41 Synthèse du 4-(4-(2-tosyloxyéthoxy)phényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione [19] et de la référence froide correspondante 20

Les deux premières étapes de ce schéma de synthèse sont identiques à celles décrites aux figures précédentes (Fig. 36 et Fig. 40).

Pour éviter les problèmes rencontrés avec le 4-(4-nitrophényl)-3*H*-1,2,4-triazole-3,5(4*H*)-dione **6a**, des tests de stabilité ont été réalisés sur le composé **17a**. Celui-ci a été placé dans les mêmes conditions que celles nécessaires au marquage. Les résultats sont encourageants car la molécule reste stable.

Pour protéger le cycle triazolidine par des groupements Boc, des études préliminaires ont montré qu'un rendement optimal de 20% est obtenu en utilisant 5 équivalents de Boc_2O . Ce rendement n'étant pas très bon, la protection par des groupements acétyle a également été testée. Cette nouvelle protection donne de meilleurs rendements de l'ordre de 65%.



¹ H	δ(ppm)	Multiplicité	Intégration	¹³ C	δ(ppm)
1 à 6	7,35-7,44	multiplet	5	1 et 3	129,5
7	1,62	singulet	2	2	128,2
10 et 14	7,08-7,10	Doublet (J = 8 Hz)	2	4 et 6	128,5
11 et 13	7,31-7,33	Doublet (J = 8 Hz)	2	5	137,0
24 et 27	2,66	singulet	6	7	71,1
				9	160,2
				10 et 14	116,5
				11 et 13	129,0
				12	122,8
				16 et 19	148,7
				22 et 23	165,7
				24 et 27	24,9

Table 16 Attribution RMN du 1,2-diacétyl-4-(4-(benzyloxy)phényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione 17b

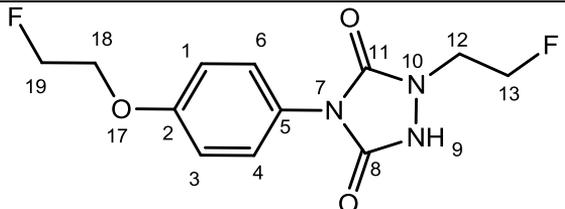
L'étape de débenzylation a été effectuée dans du méthanol sous pression d'hydrogène (3 bars) pendant 2 jours. Un rendement de 80% est obtenu.

La dernière étape est différente si nous synthétisons le précurseur **19** ou la référence froide **20**. Avant de nous pencher sur la synthèse du

précurseur, nous nous sommes attardé sur la synthèse de la référence froide **20b** en faisant réagir le 1,2-diacétyl-4-(4-hydroxyphényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione **18b** avec du 2-fluoroéthyl 4-méthylbenzènesulfonate préalablement synthétisé. La réaction, suivie par HPLC, montre l'apparition de deux pics d'intensité identique. Ceux-ci ont été séparés sur colonne HPLC semipréparative, récoltés et analysés en RMN du proton. Nous remarquons que le composé désiré **20b** n'a pas été obtenu mais un mélange de deux autres produits représentés dans les tables 17 et 18.

¹ H	δ(ppm)	Multiplicité	Intégration	J (Hz)
1 et 3	6,93-6,95	Doublet	2	8
4 et 6	7,27-7,29	Doublet	2	8
15 et 16	4,00-4,08	doublet de triplet	4	4 et 24
17 et 18	4,68-4,82	doublet de triplet	4	4 et 48

Table 17 Attribution RMN du 1,2-bis(2-fluoroéthyl)-4-(4-hydroxyphényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione



¹ H	δ(ppm)	Multiplicité	Intégration	J (Hz)
1 et 3	6,93-6,95	Doublet	2	8
4 et 6	7,29-7,31	Doublet	2	8
12	3,97-4,06	doublet de triplet	2	4 et 24
13	4,65-4,80	doublet de triplet	2	4 et 48
18	4,56-4,64	doublet de triplet	2	4 et 28
19	4,70-4,84	doublet de triplet	2	4 et 52

Table 18 Attribution RMN du 4-(4-(2-fluoroéthoxy)phényl)-1-(2-fluoroéthyl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione

Les résultats n'étant pas ceux espérés, la synthèse du précurseur **19b** n'a pas été entreprise car les réactions sont identiques et celles-ci auraient fourni sans doute les mêmes résultats. Cette voie de recherche a donc été également abandonnée.

Quelque soit la méthode utilisée, nous pouvons conclure qu'une modification de la molécule, une fois le cycle triazolidine formé, est très difficile à mettre en œuvre. Ce cycle, indispensable au [¹⁸F]PTAD doit donc être formé le plus tard possible au cours de la synthèse.

3.1.2 Radiosynthèse du [^{18}F]F-PTAD

La stratégie choisie dans un premier temps et développée dans la partie précédente (3.1.1) n'ayant pas abouti à quelque chose d'utilisable en radiochimie, nous avons donc décidé de la modifier.

Dans cette nouvelle approche, le fluor-18 sera introduit au début de la synthèse sur un précurseur, le N,N,N-triméthyl-4-nitrobenzenammonium trifluorométhanesulfonate **21**, et le [^{18}F]4-(4-fluorophényl)-3H-1,2,4-triazole-3,5(4H)-dione ([^{18}F]F-PTAD) [^{18}F]**1** sera construit à partir de ce précurseur marqué comme décrit dans la figure 42.

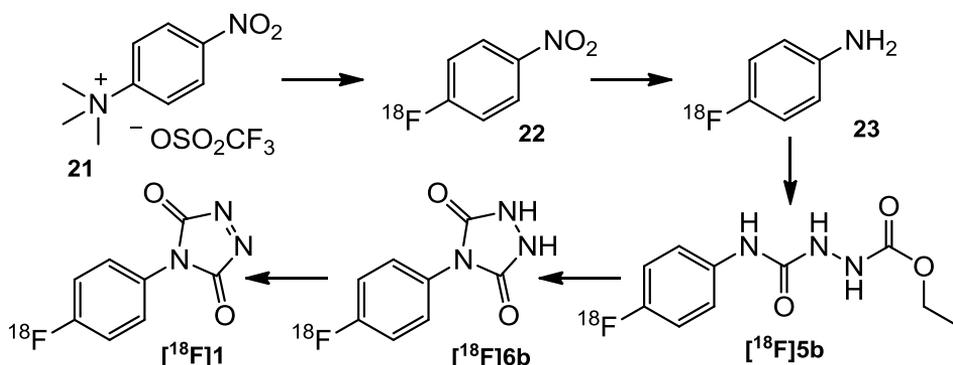


Fig. 42 Radiosynthèse du [^{18}F]4-(4-fluorophényl)-3H-1,2,4-triazole-3,5(4H)-dione [^{18}F]**1**

Le précurseur, le N,N,N-triméthyl-4-nitrobenzenammonium trifluorométhanesulfonate **21**, a été synthétisé suivant la méthode décrite en 2005 par Seimille et son équipe. Le réactif de départ est la 4-nitroaniline **24**, commercialement disponible. (118) Cette réaction, décrite dans la figure 43, s'effectue en deux étapes, la diméthylation de la 4-nitroaniline en utilisant de l'iodométhane et la quaternisation de l'amine à l'aide de trifluorométhanesulfonate de méthyle. Le précurseur **21** a été obtenu avec un rendement total de 28%.

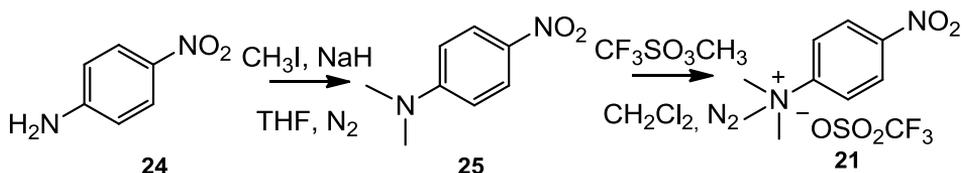


Fig. 43 Synthèse du N,N,N-triméthyl-4-nitrobenzenammonium trifluorométhanesulfonate 21

3.1.2.1 Synthèse manuelle

Les premiers essais de radiosynthèse du $[\text{}^{18}\text{F}]\text{F-PTAD}$ $[\text{}^{18}\text{F}]\mathbf{1}$ ont été réalisés à la main pour mettre au point les différentes conditions de réaction.

Durant la radiosynthèse du $[\text{}^{18}\text{F}]\text{F-PTAD}$, l'identification de tous les composés intermédiaires $[\text{}^{18}\text{F}]\text{fluorés}$ a été effectuée par analyses radio-TLC et radio-HPLC par comparaison de leurs temps de rétention et de leurs R_f avec ceux des références froides avec correspondantes. La synthèse des références froides a été réalisée comme décrite dans la partie précédente (Fig. 36). Le 4-fluoronitrobenzène **22**, le 4-fluoroaniline **23** ainsi que le F-PTAD **1** sont disponibles commercialement.

La première étape de la radiosynthèse est le marquage du précurseur **21**. (Fig. 44) Celui-ci a été réalisé dans du DMSO à 100°C pendant 10 min en utilisant les conditions classiques de marquage, $\text{KF}[\text{}^{18}\text{F}]\text{-K}_{222}/\text{K}_2\text{CO}_3$. Pour obtenir un rendement optimal, 15 mg de précurseur sont nécessaires. Le composé marqué a été obtenu avec un rendement radiochimique de $91\pm 4\%$ corrigé de la décroissance (DC). Cette réaction de marquage a été également testée dans l'acétonitrile. Le rendement est du même ordre de grandeur mais, pour éviter une évaporation de ce solvant durant le marquage, nous préférons le DMSO.

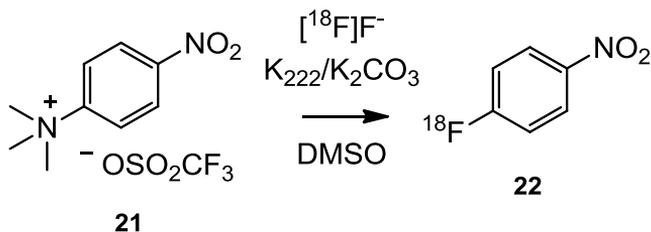


Fig. 44 Etape 1: Marquage du N,N,N-triméthyl-4-nitrobenzenammonium trifluorométhanesulfonate 21

L'étape suivante consiste à réduire le groupe nitro dans du méthanol. (Fig. 45) Le solvant de marquage doit donc préalablement être éliminé. Le [sup>18]F]4-fluoronitrobenzène **22** a donc été dilué dans 10 mL d'eau et trappé sur un cartouche Sep-Pak C18. La cartouche a été rincée avec 10 mL d'eau, ce qui permet d'éliminer le précurseur ammonium quaternaire restant. C'est une des raisons pour lesquelles ce précurseur est préféré au précurseur 1,4-dinitrobenzène, difficilement séparable, après marquage, du [sup>18]F]4-fluoronitrobenzène. Ce dernier (**22**) est ensuite élué avec du méthanol dans un récipient contenant les réactifs nécessaires à la réduction, du borohydrure de sodium et du palladium. Après 5 minutes d'agitation à température ambiante, la [sup>18]F]4-fluoroaniline est obtenue avec un rendement de 80±6 % (DC).

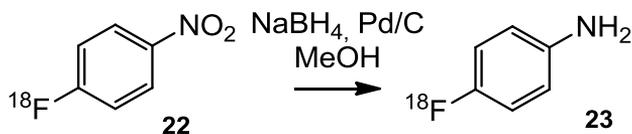


Fig. 45 Etape 2: Réduction du 4-[sup>18]F]fluoronitrobenzène 22

Pour réaliser l'étape suivante (Fig. 46), c'est-à-dire le couplage avec le carbazate d'éthyle, le palladium doit être éliminé. Le brut de réduction est dilué dans 10 mL d'eau, filtré sur un filtre en fibre de verre (Millex®) permettant de retenir le catalyseur et trappé sur une cartouche Sep-Pak® tC18 env.

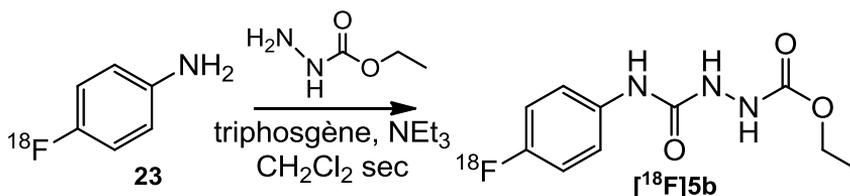


Fig. 46 Etape 3: Formation du semicarbazide [¹⁸F]5b

La première approche testée pour coupler la [¹⁸F]4-fluoroaniline avec le carbamate d'éthyle est inspirée de la méthode décrite en chimie froide par Mallakpour et son équipe. (110) Ils font réagir l'aniline avec le 4-nitrophénylchloroformate dans du THF sec, le carbamate d'éthyle est ensuite ajouté au milieu de réaction. Pour tester cette méthode de couplage, la cartouche Sep-Pak® tC18 environnementale a été éluée avec du THF. Même après passage de 2 mL, 20% de l'activité restait piégée sur la cartouche. Le couplage a été réalisé à 0°C, à température ambiante et même à 50°C, mais le rendement HPLC ne dépassait jamais 30%.

Pour réaliser ce couplage, une autre méthode décrite en chimie froide par Gobec et son équipe a été testée. (119, 120) L'aniline a été couplée avec le carbamate d'éthyle en présence de triphosgène et de triéthylamine. La [¹⁸F]4-fluoroaniline a été éluée de la cartouche avec du dichlorométhane sec dans un récipient contenant préalablement le triphosgène. La triéthylamine a été ajoutée au mélange à 0°C et le tout agité une dizaine de minutes. Cette méthode donne des rendements HPLC aux alentours de 90%, bien meilleurs que ceux obtenus précédemment.

Pour éviter la dégradation du triphosgène, l'eau doit être minimisée lors de la réaction de couplage. La cartouche est donc préalablement séchée avant l'éluion du composé [¹⁸F]fluoré. Les premiers essais de séchage de la cartouche ont été réalisés en y faisant passer 1 millilitre

d'hexane avant élution, il en résultait une perte d'activité de 5%. D'autres tests ont été réalisés en séchant la cartouche avec un flux d'azote pendant quelques minutes. Cette méthode s'est révélée efficace, beaucoup plus facile à mettre en œuvre et n'entraînant aucune perte d'activité. De plus, nous ne risquons pas d'être gênés par d'éventuelles traces d'hexane dans les étapes futures.

L'étape suivante, la cyclisation du semicarbazide **[¹⁸F]5b**, a été réalisée comme décrite par Cookson et son équipe. (Fig. 47) (111)

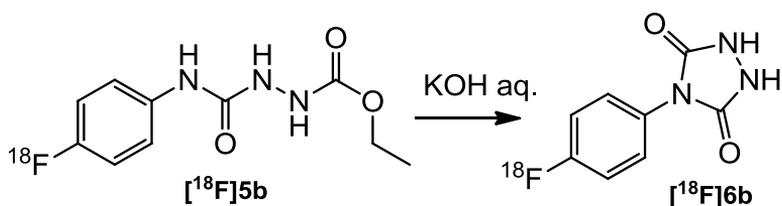


Fig. 47 Etape 4: Cyclisation du semicarbazide **[¹⁸F]5b**

Cette réaction a été réalisée dans une solution de KOH 4M. Après quelques minutes d'agitation, de l'acide chlorhydrique a été ajouté pour neutraliser la base. Notre première idée pour mettre en œuvre cette cyclisation était de la réaliser directement sur la cartouche. Le semicarbazide **[¹⁸F]5b** a été trappé sur une cartouche Sep-Pak® C18 env. et cyclisé en faisant passer une solution de KOH 4M sur cette cartouche puis une solution d'HCl pour obtenir le [¹⁸F]4-(4-fluorophényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione **[¹⁸F]6b** comme décrit dans la figure 48.

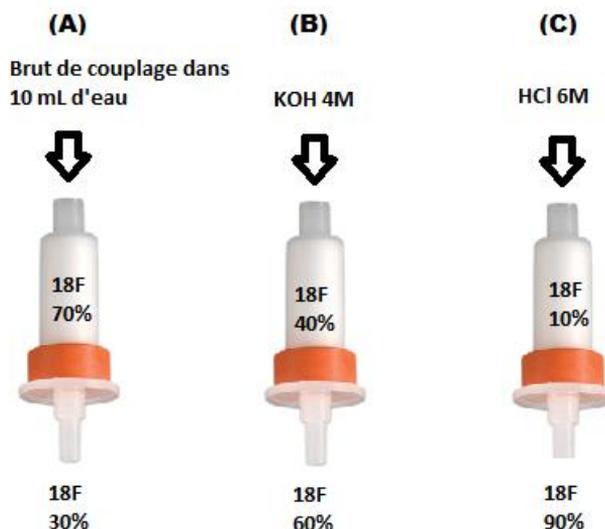


Fig. 48 Premiers essais de cyclisation du semicarbazide

Cependant cette technique possède beaucoup d'inconvénients. Premièrement, la dilution du brut de couplage (dichlorométhane) dans de l'eau donne deux phases et donc un mauvais trapping du composé [^{18}F]fluoré sur la cartouche, il y a déjà perte de 30% de l'activité (Fig. 48A). Ensuite, le passage lent de la solution basique sur la cartouche décroche 60% de l'activité restante (Fig. 48B). Enfin, l'acide chlorhydrique décroche, au final, 90% de l'activité restante sur la cartouche (Fig. 48C). Le produit cyclisé est donc obtenu dans une solution aqueuse à la sortie de la cartouche. L'étape suivante s'effectuant dans l'acétonitrile, une cartouche sera encore nécessaire pour changer le solvant.

A cause de tous ces inconvénients, nous avons décidé de changer de stratégie. Après le couplage entre l'aniline et le carbazate d'éthyle, le dichlorométhane a été évaporé et la solution de KOH 4M ajoutée sur le résidu. Après 5 minutes d'agitation, le mélange basique a été neutralisé par de l'acide chlorhydrique. Le brut de réaction dilué avec 10 mL d'eau,

la [^{18}F]4-(4-fluorophényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione [^{18}F]**6b** a été trappée sur une cartouche Sep-Pak® tC18⁺ short. Un flux d'air à travers la cartouche permet d'éliminer un maximum de solvant et le composé [^{18}F]fluoré a ensuite été élué avec de l'acétonitrile. Le rendement radiochimique (DC) pour les deux dernières étapes décrites, le couplage et la cyclisation, est de 65±5%.

La dernière étape nécessaire pour obtenir le [^{18}F]4-(4-fluorophényl)-1,2,4-triazole-3,5-dione est l'oxydation du cycle triazolidine. (Fig. 49)

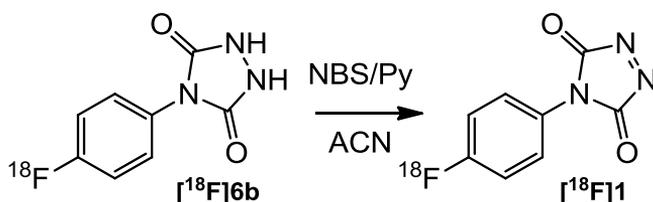


Fig. 49 Etape 5: Oxydation du cycle triazolidine

Parmi les méthodes précédemment présentées (Table 7), le mélange N-bromosuccinimide/pyridine dans l'acétonitrile a été utilisé comme décrit et testé par Ban et son équipe. (106) Le [^{18}F]4-(4-fluorophényl)-1,2,4-triazole-3,5-dione [^{18}F]**1** étant très instable, le brut d'oxydation a été directement impliqué, sans purification, dans la réaction de couplage avec la tyrosine. Le [^{18}F]4-(4-fluorophényl)-1,2,4-triazole-3,5-dione [^{18}F]**1** a été obtenu après 1h30 de synthèse avec un rendement de 50% (DC).

3.1.2.2 Automatisation sur FastLab®

Lors des radiosynthèses multi-étapes, le temps est une notion à ne pas laisser de côté. Le fluor-18 ayant une demi-vie de 109 minutes, la radiosynthèse ne doit pas dépasser deux ou trois heures. Dans notre cas, la synthèse du synthon $[^{18}\text{F}]4\text{-}(4\text{-fluorophényl})\text{-}1,2,4\text{-triazole}\text{-}3,5\text{-dione}$ $[^{18}\text{F}]\mathbf{1}$ nécessite déjà 1h30. Pour pouvoir étudier correctement le couplage de ce dernier avec la tyrosine, il faut donc partir avec assez d'activité au départ de la synthèse du synthon. Pour éviter d'exposer l'opérateur inutilement, le début de la synthèse est implémenté sur le FastLab®, module de synthèse de chez GE Healthcare, disposant d'un accès libre au logiciel de programmation. La cassette utilisée est schématisée sur la figure 50.

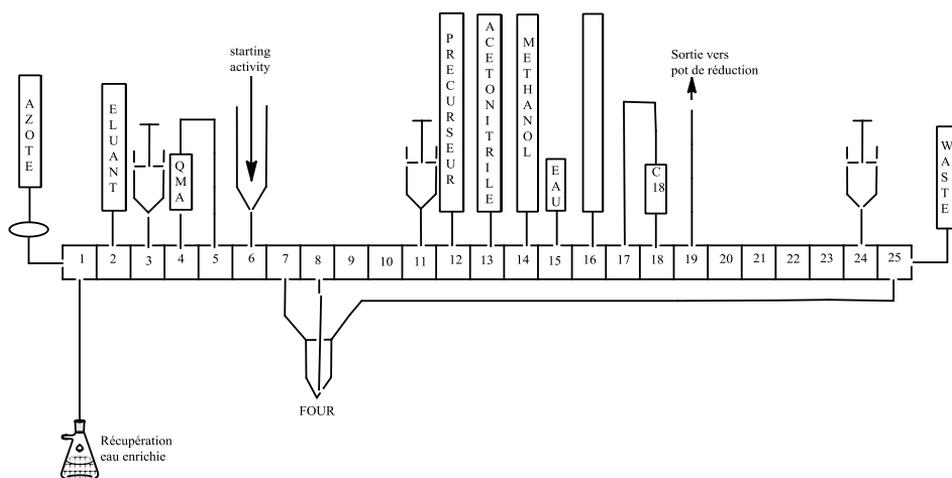


Fig. 50 Cassette utilisée pour le début de la synthèse au FastLab du $[^{18}\text{F}]4\text{-}(4\text{-fluorophényl})\text{-}1,2,4\text{-triazole}\text{-}3,5\text{-dione}$ $[^{18}\text{F}]\mathbf{1}$

L'activité arrive sur la cassette en position 6, elle est trappée sur la QMA en position 4. Ensuite, la QMA est éluée dans un récipient initialement disposé dans le four. Pendant l'évaporation de cette solution, le précurseur en position 12 est dissout dans de l'acétonitrile. A cause du volume mort des récipients, 20 mg de précurseur sont nécessaires.

Contrairement à la synthèse manuelle, le DMSO a été remplacé par l'acétonitrile comme solvant de marquage. En effet, le précurseur en solution dans le DMSO donne un mélange trop visqueux. Le transfert de ce dernier dans le récipient contenu dans le four pour le marquage n'est pas quantitatif, il reste des gouttes le long des tuyaux.

Après marquage et dilution dans de l'eau, le composé marqué est trappé sur la C18 en position 18. La cartouche est rincée avec de l'eau pour éliminer toutes traces de précurseur et séchée avec un flux d'azote. Le [^{18}F]4-fluoronitrobenzène **22** est alors élué avec du méthanol directement dans un récipient blindé (sortie : position 19), contenant le borohydrure de sodium ainsi que le palladium, prêt pour l'étape de réduction. Le reste de la synthèse se déroule manuellement comme décrit précédemment (3.1.2.1). Des recherches sont actuellement en cours dans notre laboratoire pour rendre cette radiosynthèse complètement automatisable.

3.1.3 Couplage entre le [^{18}F]F-PTAD et la N-acétyl tyrosine méthylamide

Le synthon [^{18}F]4-(4-fluorophényl)-1,2,4-triazole-3,5-dione [^{18}F]1 obtenu, celui-ci a été couplé à une tyrosine. Des études préliminaires ont été réalisées en utilisant la N-acétyl tyrosine méthylamide **2** comme modèle, comme décrit par Ban et al. (106) (Fig. 51)

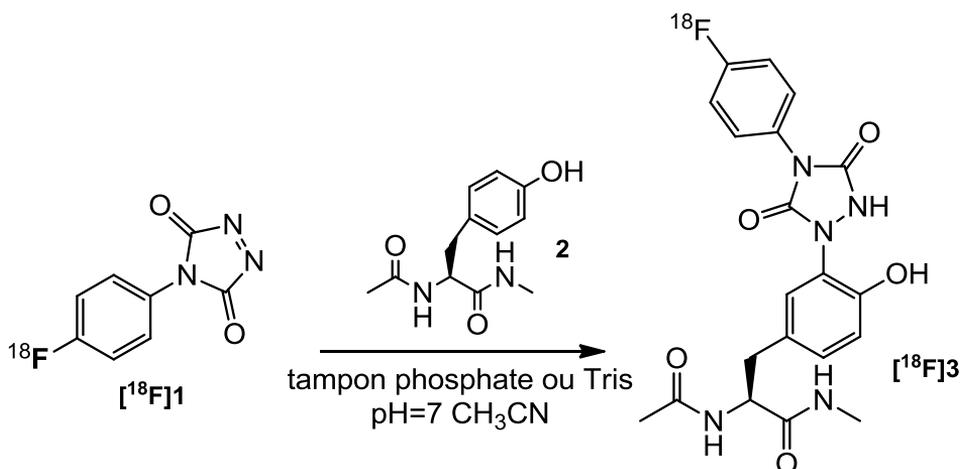


Fig. 51 Couplage entre le $[^{18}\text{F}]$ F-PTAD $[^{18}\text{F}]$ 1 et la N-acétyl tyrosine méthylamide 2

Le composé $[^{18}\text{F}]$ fluoré couplé, le $[^{18}\text{F}]$ (S)-2-acétamido-3-(4-hydroxy-3-(4-(4-fluorophényl) - 3,5 - dioxo - 1,2,4 - triazolidin - 1 - yl) phényl) - N - méthylpropanamide, $[^{18}\text{F}]$ 3 a été obtenu après couplage du $[^{18}\text{F}]$ F-PTAD $[^{18}\text{F}]$ 1 et la N-acétyl tyrosine méthylamide 2 dans une solution à volume égal de tampon phosphate 100 mM à pH=7 et d'acétonitrile. Le rendement de cette réaction est de $43\pm 6\%$.

Dans certains cas, quand les tyrosines sont moins accessibles, notamment dans les protéines, le PTAD peut se décomposer en isocyanate. Ce dernier peut facilement réagir avec les amines des lysines de la protéine. (107, 121) Ce problème peut être résolu en utilisant, à la place du tampon phosphate, un tampon Tris. L'amine primaire du 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol piège les isocyanates présents dans le milieu. Dans notre cas, la réaction a été réalisée dans les deux milieux tamponnés avec des rendements similaires.

Après couplage, le brut de réaction a été dilué dans de l'eau et purifié par HPLC semipréparative. Le chromatogramme est donné à la figure 52.

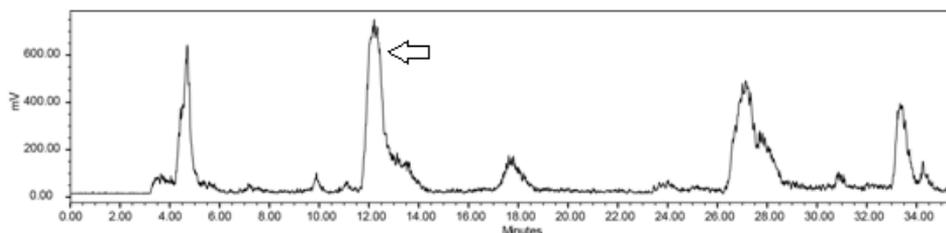


Fig. 52 Chromatogramme HPLC semipréparative du brut de couplage

Le pic à 12 minutes a été récolté et injecté en HPLC analytique pour vérifier sa pureté. Les chromatogrammes de la figure 53 montrent que le produit recherché a été obtenu avec une grande pureté. La différence de temps de rétention est dû au fait que le détecteur radiochimique se situe après le PDA.

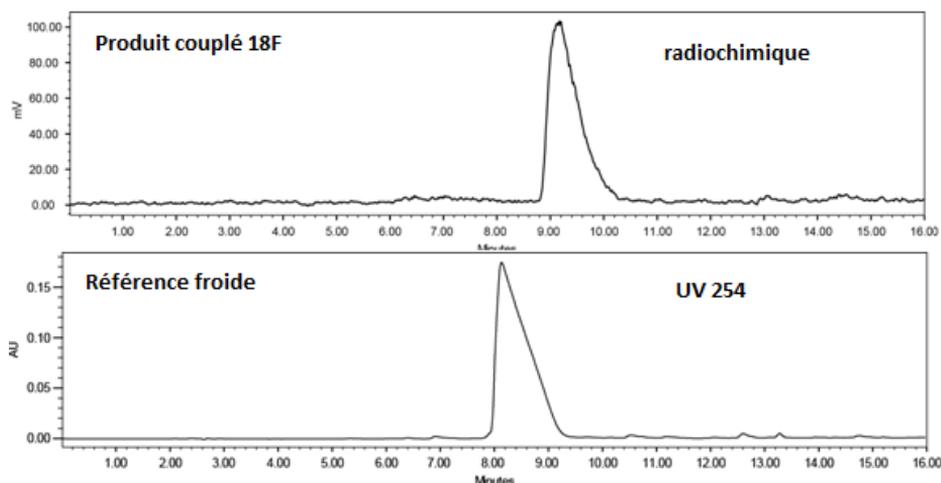


Fig. 53 Chromatogrammes HPLC analytiques du couplage entre [^{18}F]F-PTAD et de la N-acétyl tyrosine méthylamide 2 et sa référence froide.

Le rendement radiochimique global, qui reprend la synthèse du [^{18}F]F-PTAD, la réaction de ce synthon avec la N-acétyl tyrosine méthylamide 2 et la purification HPLC, est de 20%. Le temps de radiosynthèse est, quant à lui, de 2h30. Ce qui est un temps tout à fait acceptable lors de la synthèse d'un composé radiopharmaceutique porteur d'un atome de fluor-18.

Au départ de cette radiosynthèse +/- 50 mCi (1,85 GBq) de [¹⁸F]F⁻ sont utilisés pour obtenir +/- 4 mCi (148 MBq) de [¹⁸F]F-PTAD couplé à la tyrosine après les 150 minutes de synthèse. Cette radiosynthèse n'a pas été réalisée à haute activité.

3.2 Marquage de siRNA

La deuxième partie de ce travail consiste à synthétiser des linkers porteurs d'un groupement alcyne permettant de lier un groupe prosthétique marqué au fluor-18 et porteur d'une fonction azoture à un siRNA.

3.2.1 Synthèse de linker

La structure des linkers couplés au siRNA doit répondre à un certain nombre de critères. Ces petites molécules organiques devront:

- Posséder un groupement alcyne permettant la réaction de chimie click avec un groupement prosthétique [¹⁸F]fluoré porteur d'une fonction azoture.

- Posséder un alcool secondaire permettant leurs attachements au support solide.

- Posséder un alcool primaire protégé par un groupe diméthoxytrityle (DMTr) car c'est à partir de ce groupement protecteur que démarrera la synthèse du siRNA.

- Etre des dérivés d'acides aminés naturels et présentant une stéréochimie bien définie, le linker choisi doit pouvoir imiter le plus possible un sucre de la chaîne oligonucléotidique pour limiter au maximum les risques de dégradation *in vivo*. (122, 123)

A l'inverse du premier critère, la fonction azoture portée par le linker et la fonction alcyne portée par le groupement prosthétique [¹⁸F]fluoré serait également un choix possible. Cependant, le linker étant à la base de la synthèse du siRNA et la fonction azoture étant relativement réactive, nous avons préféré ne pas utiliser cette combinaison pour éviter toutes réactions de l'azoture durant la synthèse du siRNA. De plus, un

synthon [^{18}F]fluoré porteur d'une fonction azoture était facilement disponible dans notre laboratoire : le 1-(azidométhyl)-4- ^{18}F fluorobenzène [^{18}F]26. (73)

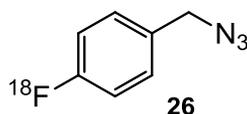


Fig. 54 Synthon 1-(azidométhyl)-4- ^{18}F fluorobenzène [^{18}F]26

Deux linkers (**27** et **28**), respectant ces critères ont été synthétisés lors de ce travail : le (2*S*,4*R*)-*N*-(6-heptynoyl)-4-hydroxy prolinol **27** et sa version linéaire, le *N*-((2*R*,3*R*)-1,3-dihydroxy-2-butanyl)-6-heptynamide **28**. Ils sont représentés dans la figure suivante.

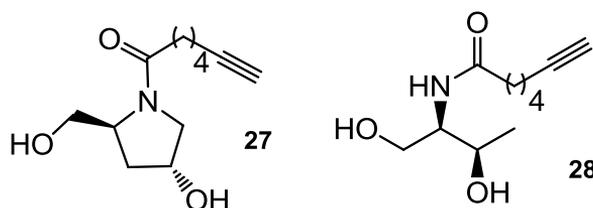


Fig. 55 Linker 27: (2*S*,4*R*)-*N*-(6-heptynoyl)-4-hydroxy prolinol. Linker 28: *N*-((2*R*,3*R*)-1,3-dihydroxy-2-butanyl)-6-heptynamide

Ces linkers ont été choisis car ils dérivent d'acides aminés naturels. La taille de la chaîne latérale porteuse de la fonction alcyne permet à la réaction de chimie click de se faire facilement. Cette chaîne latérale pourrait être remplacée par un polyéther permettant ainsi à la molécule de gagner en solubilité. Cependant, ces chaînes polyéthers possédant un acide carboxylique et un alcyne respectivement à leurs extrémités ne sont pas commercialement disponibles contrairement à la molécule que nous avons utilisée.

Les synthèses de ces deux linkers sont décrites dans les paragraphes 3.2.1.1 et 3.2.1.2.

3.2.1.1 Synthèse du linker 27 : le (2S,4R)-N-(6-heptynoyl)-4-hydroxy prolinol

Le linker **27** est un dérivé de la proline. Cette structure nous semble très prometteuse car elle mimique la structure d'un sucre de la chaîne oligonucléotidique. (122, 123) Plusieurs voies de synthèse ont été testées pour synthétiser ce linker **27**.

La première voie de synthèse réalisée pour le linker **27** est décrite dans la figure 56.

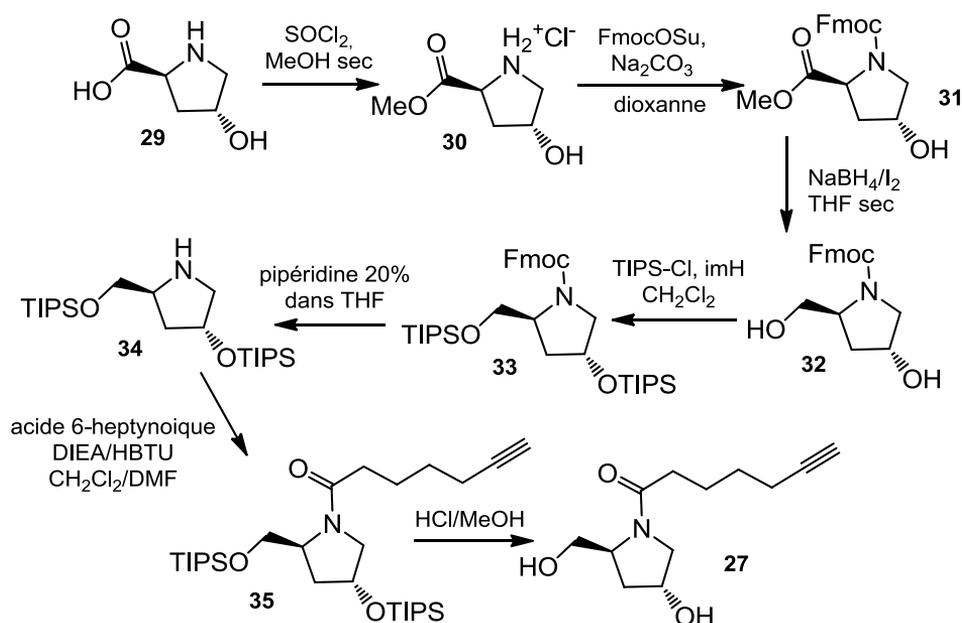
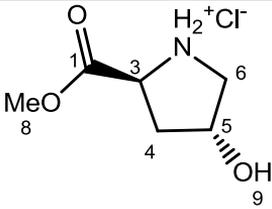


Fig. 56 Première voie de synthèse du linker 27, le (2S,4R)-N-(6-heptynoyl)-4-hydroxy prolinol

Le réactif de départ, commercialement disponible, est la trans-4-hydroxy-L-proline **29**. Cette première stratégie est basée sur une suite de protections et de déprotections utilisant différents groupements protecteurs et ceci pour éviter un maximum de réactions secondaires.

La première étape de cette synthèse est l'estérification de l'acide carboxylique de la trans-4-hydroxy-L-proline **29** à l'aide de chlorure de thionyle dans du méthanol pour donner le composé **30** avec un rendement supérieur à 95%. (124)



¹ H	δ(ppm)	Multiplicité	Intégration	¹³ C	δ(ppm)
3 et 5	4,64-4.72	Multiplet	2	1	170,1
4a	2,27	Multiplet	1	3	53,8
4b	2,49	Multiplet	1	4	36,6
6a	3,36	Multiplet	1	5	69,3
6b	3,52	Multiplet	1	6	58,1
8	3,83	Singulet	3	8	53,4

Table 19 Attribution RMN du chlorure de (2S,4R)-4-Hydroxy-2-(méthoxycarbonyl) pyrrolidinium 30

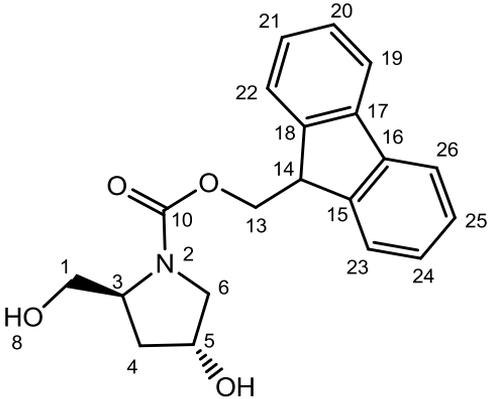
Le proton 3 ayant un déplacement chimique proche de celui du proton 5, les deux protons apparaissent au même endroit sur le spectre. Cette molécule étant rigide, les deux protons en position 4 ainsi que les deux protons en position 6 ont des déplacements chimiques légèrement différents.

La deuxième étape est la protection de l'amine secondaire par un groupement fluorenylméthoxy-carbonyle (Fmoc) (125). Ce groupement a été choisi car il est facilement éliminable par de la pipéridine et surtout il contient un groupement chromophore, ce qui facilite considérablement la détection de la molécule. (126) Le composé **31** a été obtenu avec un rendement de 60%.

¹ H	δ(ppm)	Multiplicité	Intégration	J (Hz)	¹³ C	δ(ppm)
3	4,28	Triplet	1	6,8	1	173,2
4a	2,14	Multiplet	1		3	52,5
4b	2,35	Multiplet	1		4	39,3
5 et 13	4,35-4,57	Multiplet	3		5	70,1
6a	3,57	Doublet	1	11,8	6	58,0
6b	3,69	Doublet de doublet	1	6,8 et 11,8	8	55,3
8	3,77	Singulet	3		10	155,0
14	4,18	Triplet	1	6,2	13	67,8
19 à 26	7,33-7,79	Multiplet	8		14	47,2
					De 15 à 26	De 120,0 à 144,9 (6 pics)

Table 20 Attribution RMN de l'ester méthylique dérivé de l'acide (2S,4R)-N-(fluoren-9-ylméthoxycarbonyl)-4-hydroxypyrrolidine-2-carboxylique 31

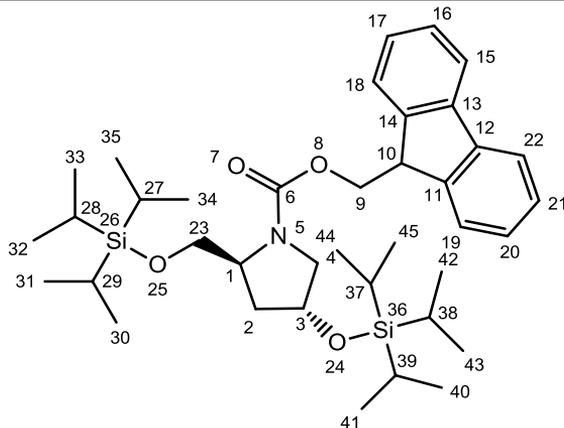
La troisième étape consiste à réduire l'ester à l'aide de borane généré in situ par un mélange NaBH_4/I_2 (127), ou à l'aide d'un mélange $\text{NaBH}_4/\text{LiCl}$ (128). Les deux techniques se valent et le composé 32 a été obtenu, dans les deux cas, avec des rendements de l'ordre de 50%.



¹ H	δ(ppm)	Multiplicité	Intégration	¹³ C	δ(ppm)
1a	3,64	Multiplet	1	1	67,7
1b	3,69	Multiplet	1	3	55,6
3 et 14	4,14-4,19	Multiplet	2	4	37,4
4a	1,73	Multiplet	1	5	69,2
4b	2,00	Multiplet	1	6	59,3
5 et 13	4,34-4,38	Multiplet	3	10	157,2
6a	3,40	Multiplet	1	13	66,1
6b	3,53	Multiplet	1	14	47,2
19 à 26	7,28-7,74	Multiplet	8	De 15 à 26	De 120,0 à 143,9 (6 pics)

Table 21 Attribution RMN du (2S,4R)-N-(fluoren-9-ylméthoxycarbonyl)-4-hydroxy prolinol **32**

L'étape suivante consiste à protéger les deux alcools par du chlorure de triisopropylsilyle (TIPSCI) pour obtenir le composé **33** avec 90% de rendement. (129) Ces groupements protecteurs ont été choisis car ils étaient stables en milieu basique, ne risquaient pas d'être éliminés lors de la déprotection du Fmoc et pouvaient s'enlever facilement en présence de fluorure de tétra-n-butylammonium (TBAF) ou en milieu acide. (126)

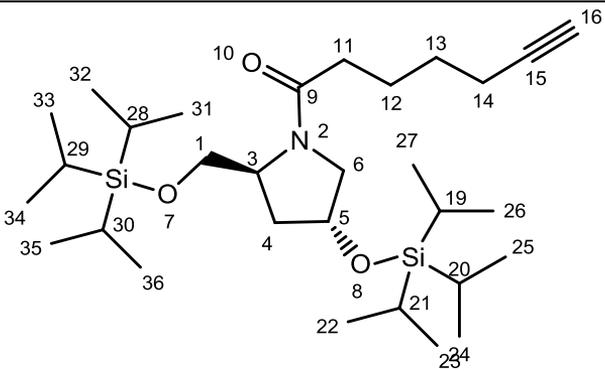


¹ H	δ(ppm)	Multiplicité	Intégration	¹³ C	δ(ppm)
1	4,23	Multiplet	1	1	55,8
2a	2,08	Multiplet	1	2	37,7
2b	2,24	Multiplet	1	3	70,2
3	4,35	Multiplet	1	4	58,5
4a	3,45	Multiplet	1	6	155,1
4b	3,56	Multiplet	1	9	64,2
9	4,65	Multiplet	2	10	47,5
10	4.05	Multiplet	1	De 11 à 22	De 120,1 à 144,4 (6 pics)
15 à 22	7,20-7,74	Multiplet	8	23	66,1
23a	3,65	Multiplet	1	27 à 29 et 37 à 39	17,9
23b	3,70	Multiplet	1	30 à 35 et 40 à 45	12,1
27 à 29 et 37 à 39	1,26	Multiplet (J=7,1 Hz)	6		
30 à 35 et 40 à 45	0,9	Doublet (J=7,1 Hz)	36		

Table 22 Attribution RMN du (2S,4R)-(9H-fluoren-9-yl)méthyl-4-((triisopropylsilyl)oxy)-2-(((triisopropylsilyl)oxy)méthyl)pyrrolidine-1-carboxylate 33

Après protection des deux groupes alcools par des groupes triisopropylsilyles, le groupement Fmoc a été enlevé par une solution de pipéridine à 20% dans du THF sans risques de détruire les autres protections. Le groupement chromophore du Fmoc n'étant plus présent, la formation de la (2S,4R)-4-((triisopropylsilyl)oxy)-2-(((triisopropylsilyl)oxy)-méthyl)pyrrolidine **34** a été détectée en TLC en utilisant l'iode comme révélateur. Aucune purification de ce composé n'a été réalisée et le résidu obtenu après évaporation de la solution de pipéridine/THF a directement été utilisé pour l'étape suivante.

Cette étape consiste en l'introduction, sur l'amine libre, d'une chaîne aliphatique contenant une fonction alcyne. Pour ce faire, l'acide 6-heptynoïque a été utilisé. D'autres acides, porteurs d'une fonction alcyne, auraient pu également convenir, par exemple : l'acide 5-hexynoïque ou l'acide 4-pentynoïque. Ces trois acides ont des prix relativement proches, de 19 à 35 €/gramme (SigmaAldrich). L'acide 6-heptynoïque a été couplé à l'amine libre en présence de diisopropyléthylamine (DIEA) et de HBTU. Les meilleurs rendements pour cette étape ont été obtenus dans un mélange de diméthylformamide et de dichlorométhane. (130) Ce composé **35**, ne contenant pas de groupements chromophores, a été révélé en TLC par traitement thermique après vaporisation d'une solution éthanolique contenant 5% d'anisaldéhyde et 5% d'acide sulfurique concentré. Il a été obtenu avec un rendement de 60%.



¹ H	δ(ppm)	Multiplicité	Intégration	¹³ C	δ(ppm)
1	3,61	Doublet (J=8 Hz)	2	1	67,3
3	4,27	Multiplet	1	3	56,3
4, 11 et 14	1,92-2,21	Multiplet	6	4	37,2
5	4,68	Multiplet	1	5	71,0
6a	3,28	Multiplet	1	6	57,8
6b	4,05	Multiplet	1	9	171,4
12	1,72	Multiplet	2	11	34,4
13	1,57	Multiplet	2	12	24,0
16	1,89	Singulet	1	13	28,3
De 19 à 21 et de 28 à 30	1,16	Multiplet (J=7,3 Hz)	6	14	18,1
De 22 à 27 et de 31 à 36	1,02	Doublet (J= 7,3 Hz)	36	15	84,3
				16	63,7
				De 19 à 21 et de 28 à 30	17,9
				De 22 à 27 et de 31 à 36	12,0

Table 23 Attribution RMN du 1-((2S,4R)-4-((triisopropylsilyl)oxy)-2-(((triisopropylsilyl)oxy) méthyl)pyrrolidin-1-yl)hept-6-yn-1-one 35

Les groupements TIPS, nécessaires durant le couplage pour éviter la réaction des alcools, peuvent être maintenant déprotégés à l'aide d'une solution 1,5 M en HCl dans du méthanol. Cette solution a été préparée en faisant buller du HCl gazeux dans du méthanol. L'acide chlorhydrique gazeux a été obtenu en faisant tomber goutte à goutte de l'acide sulfurique concentré sur du NaCl solide. D'autres méthodes de déprotection ont été testées comme l'utilisation du TBAF dans du THF, mais ce composé est difficilement éliminable après réaction même par une extraction liquide-liquide car le composé **27**, le (2S,4R)-N-(6-heptynoyl)-4-hydroxy prolinol, est partiellement soluble en phase aqueuse. Un mélange HCl aqueux 0,1 M / éthanol 1/1 a également été testé pour la déprotection des groupements TIPS mais dans ces conditions les rendements sont très faibles (<15%). L'utilisation de la solution d'acide chlorhydrique dans du méthanol a permis d'obtenir de meilleurs rendements, de l'ordre de 30 à 40%.

Une analyse cristallographique a été réalisée sur le composé **27** pour confirmer sa structure trans et vérifier qu'il n'y ait pas eu racémisation. Les résultats obtenus, présentés dans la partie « Matériel et méthodes », confirment la présence d'un seul diastéréoisomère.

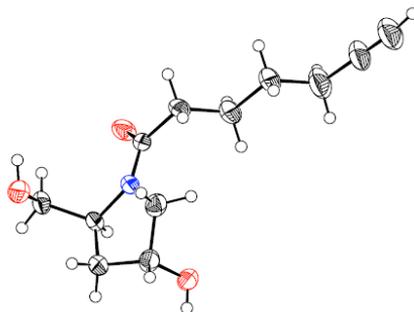
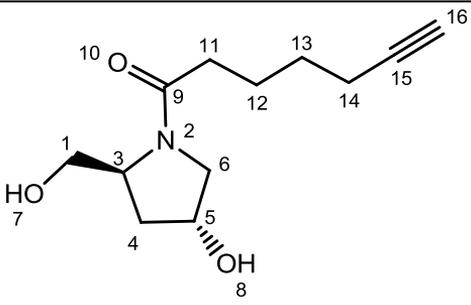


Fig. 57 Analyse cristallographique (ORTEP) du composé 27, le (2S,4R)-N-(6-heptynoyl)-4-hydroxy prolinol



¹ H	δ(ppm)	Multiplicité	Intégration	¹³ C	δ(ppm)
1 et 6	3,51-3,70	Multiplet	4	1	69,2
3	4,33	Multiplet	1	3	56,7
4a	1,96	Multiplet	1	4	37,5
4b	2,11	Multiplet	1	5	79,5
5	4,45	Multiplet	1	6	60,3
11	2,25-2,44	Multiplet	2	9	175,0
12 et 16	1,67-1,82	Multiplet	3	11	35,2
13	1,54-1,63	Multiplet	2	12	24,3
14	2,23	Multiplet	2	13	28,4
				14	18,7
				15	84,6
				16	66,9

Table 24 Attribution RMN du (2S,4R)-N-(6-heptynoyl)-4-hydroxyprolinol 27

A cause du grand nombre d'étapes, nécessitant presque toutes une purification sur colonne de silice, et du très faible rendement obtenu à la fin de cette synthèse (seulement 5%), un autre schéma de synthèse a été développé. Cette nouvelle stratégie est présentée dans la figure 58.

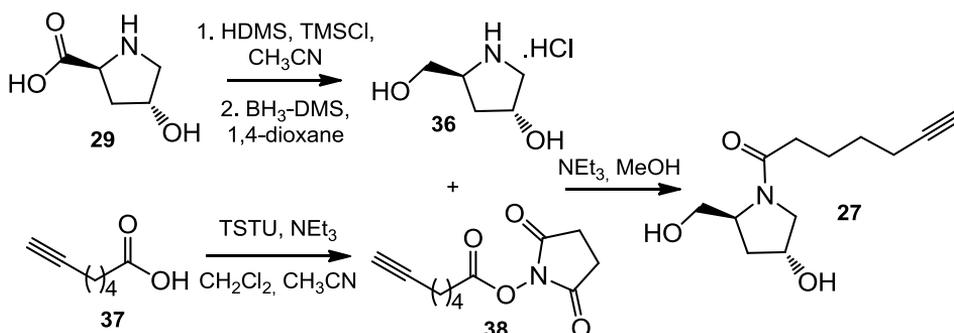


Fig. 58 Deuxième voie de synthèse du linker 27, le (2S,4R)-N-(6-heptynoyl)-4-hydroxy prolinol

Le produit de départ de cette synthèse est également la trans-4-hydroxy-L-proline **29**. Celle-ci a subi directement une réduction quantitative pour donner le trans-4-hydroxy-L-prolinol en utilisant un complexe de diméthylsulfure et de borane. (131, 132) Cette méthode a été préférée à celle plus couramment utilisée, comme l'utilisation de $LiBH_4$ ou $LiAlH_4$, car elle donne des rendements quantitatifs.

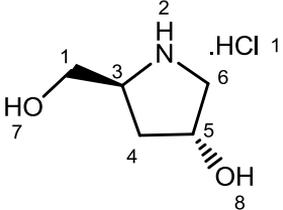
						
¹ H	δ(ppm)	Multiplicité	Intégration	J (Hz)	¹³ C	δ(ppm)
1a	3,80	Doublet de doublet	1	6,9 et 12,5	1	69,2
1b	4,01	Doublet de doublet	1	3,5 et 12,5	3	56,7
3	4,12	Multiplet	1		4	37,5
4a	2,05	Multiplet	1		5	79,5
4b	2,23	Multiplet	1		6	60,3
5	4,75	Multiplet	1			
6a	3,41	Doublet de doublet	1	6,2 et 12,7		
6b	3,53	Doublet de doublet	1	3,8 et 12,7		

Table 25 Attribution RMN du (2S,4R)-4-hydroxyprolinol hydrochloride 36

Pour pouvoir coupler directement, sans protection des alcools, l'acide 6-heptynoïque **37** au trans-4-hydroxy prolinol **36**, plusieurs agents de couplage ont été testés. Ces derniers sont couramment utilisés dans le cas de formation de liaisons peptidiques. Ils sont connus pour tolérer les groupements hydroxyles libres et montrent une meilleure sélectivité pour la N-acylation en comparaison à l'O-acylation. Quatre formes activées dérivées de l'acide 6-heptynoïque ont été synthétisées avec l'aide de quatre agents activateurs (Table 26): l'ester de succinimidyde **38** (133) obtenu à l'aide du TSTU, le N-acylthiazolidinéthione **39** (134) obtenu à l'aide de la 2-thiazolin-2-thiol (TTH), l'ester de pentafluorophényle **40** (135, 136) obtenu à l'aide du pentafluorophénol et le N-acylbenzotriazole

41 (137) obtenu à l'aide du 1*H*-benzotriazole. Les différents agents activateurs, les acides activés correspondants ainsi que les rendements obtenus lors de leurs synthèses sont repris dans la table 26.

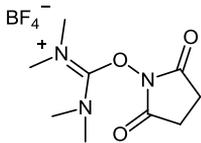
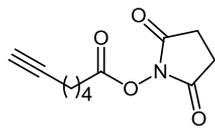
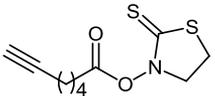
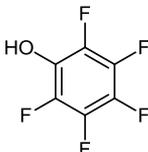
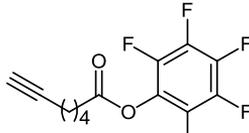
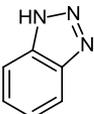
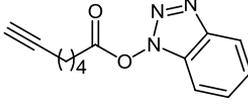
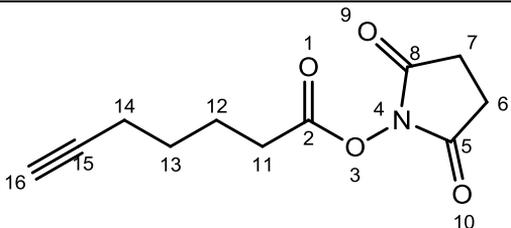
N°	Agents activateurs	Acides activés	Rendement
38	TSTU 		91%
39	TTH 		38%
40	Pentafluorophenol 		31%
41	1 <i>H</i> -benzotriazole 		33%

Table 26 Agents activateurs de l'acide 6-heptynoïque et acides activés correspondants

Les couplages réalisés avec la TTH, le pentafluorophénol et le 1*H*-benzotriazole nécessitent la formation in situ de leur chlorure d'acide à l'aide du SOCl₂ ou du chlorure d'oxalyle. L'agent activateur donnant le meilleur rendement pour la synthèse de l'acide activé est le TSTU. Seule l'analyse RMN ¹H pour cet acide activé **38** est développée ici, les autres se retrouvent dans la partie « Matériel et méthodes ».



¹ H	δ(ppm)	Multiplicité	Intégration	J (Hz)
6 et 7	2,79	Multiplet	4	
11	2,61	Triplet	2	7,4
12	1,79-1,88	Multiplet	2	
13	1,55-1,66	Multiplet	2	
14	2,21	Triplet de doublet	2	2,6 et 7,4
16	1,94	Triplet	1	2,6

Table 27 Attribution RMN ¹H pour la 1-(6-heptynoyl)pyrrolidine-2,5-dione **38**

Ces différents acides activés peuvent donc être directement couplés au trans-4-hydroxyprolinol pour donner le composé **27**, le (2S,4R)-N-(6-heptynoyl)-4-hydroxy prolinol. La table 28 reprend les différentes conditions de réaction ainsi que les rendements obtenus lors des différents couplages.

Agent activateur	Solvant	Eq. Agent activateur	Eq. NEt ₃	Temps	Rendement
38	MeOH	0.5	3	1h30	60%
39	THF	0.9	5	1h30	34%
40	CH ₂ Cl ₂	1.1	2.1	20h	13.5%
41	MeOH	1	2.1	24h	15%

Table 28 Conditions de réaction pour le couplage entre les acides actives et le trans-4-hydroxy prolinol

Le couplage le plus efficace est celui réalisé avec l'acide activé par le TSTU **38**. Le linker synthétisé via cette seconde méthode est obtenu avec un rendement de 60%, ce qui est considérablement mieux que les 5% de rendement obtenus précédemment.

Pour pouvoir être attaché au support solide et être le point de départ de la séquence oligonucléotidique, le linker **27** obtenu doit subir deux modifications. Ces deux étapes sont décrites dans la figure 59.

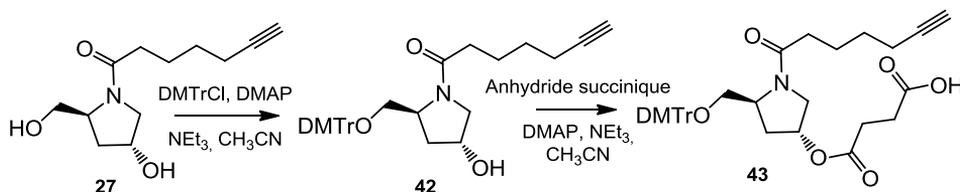


Fig. 59 Synthèse du composé 43: l'acide 4-((3S,5R)-5-((diméthoxytrityloxy)méthyl)-1-(6-heptynyl)-3-pyrrolidinyloxy)-4-oxobutanoïque

Comme expliqué dans l'introduction, la synthèse de l'oligonucléotide débute sur un alcool primaire protégé par un groupe diméthoxytrityle (DMTr). Ce dernier a été introduit sur le linker **27** dans des conditions basiques : triéthylamine, diméthylaminopyridine (DMAP) et acétonitrile.

Le carbocation diméthoxytrityle (DMTr^+) étant très stable, ce groupement protecteur est, dès lors, très facile à enlever. Le composé protégé est difficilement visible en spectrométrie de masse car le groupe DMTr s'élimine avec le 0,1% d'acide acétique présent dans le co-solvant du spectromètre. Le carbocation DMTr^+ , possédant une masse de 303, est, quant à lui, très visible. L'acidité de la silice utilisée lors des purifications sur colonne est également suffisante pour éliminer ce groupement protecteur. Dans un premier temps, celle-ci est neutralisée par de la triéthylamine présente dans l'éluant mais finalement la silice utilisée est totalement remplacée par de l'alumine neutre.

Une autre conséquence à la grande stabilité du carbocation DMTr^+ est que le chlorure de diméthoxytrityle se dégrade très rapidement. Ce réactif sera donc recristallisé avant chaque utilisation. Pour ce faire, il est dissous à reflux dans une solution de toluène contenant 20% de chlorure

d'acétylé. La solution est agitée jusqu'à la fin du dégagement gazeux. Ensuite le chlorure d'acétylé est évaporé, de l'éther de pétrole est ajouté et le composé est recristallisé. La cristallisation de ce composé est très lente, de l'ordre de plusieurs heures.

Malgré toutes ces précautions, les meilleurs rendements obtenus lors de cette étape pour obtenir le composé **42**, sont de l'ordre de 15%.

¹ H	δ(ppm)	Multiplicité	Intégration	¹³ C	δ(ppm)
1a	3,14	Multiplet	1	1	69,3
1b	3,26	Multiplet	1	3	56,6
3	3,72	Multiplet	1	4	38,5
4a	2,26	Multiplet	1	5	70,6
4b	2,29	Multiplet	1	6	63,8
5	4,62	Multiplet	1	9	171,3
6a	3,43	Multiplet	1	11	34,8
6b	3,49	Multiplet	1	12	24,4
11	2,23	Triplet (J = 7,5 Hz)	2	13	28,5
12	1,77	Multiplet	2	14	18,6
13	1,61	Multiplet	2	15	84,4
14	2,13	Triplet	2	16	68,8

		(J = 7,5 Hz)			
16	1,93	Singulet	1	17	86,1
De 21 à 35	6,82-7,37	Multiplet	13	De 18 à 35	De 113,4 à 158,6 (8 pics)
38 et 39	3,79	Singulet	6	38 et 39	55,5

Table 29 Attribution RMN du 1-((2S,4R)-2-((diméthoxytrityloxy)méthyl)-4-hydroxy-1-pyrrolidinyl)-1-(6-heptyn)one 42

La dernière étape consiste à faire réagir l'alcool secondaire avec de l'anhydride succinique. Ce « bras » permettra la liaison du composé **43** au support solide. Cette réaction a été réalisée à l'aide de DMAP et de triéthylamine dans la pyridine. Le composé désiré a été purifié par HPLC préparative sur phase inverse. Le rendement de cette réaction est de 25%.

Ce composé **43** pourra donc être attaché au support solide et l'ensemble sera le point de départ de la synthèse de l'oligonucléotide.

¹ H	δ(ppm)	Multiplicité	Intégration	¹³ C	δ(ppm)
1	3,32	Multiplet	2	1	77,8
3	3,77	Multiplet	1	3	52,2
4	2,54	Multiplet	2	4	31,9
5	4,29	Multiplet	1	5	74,6
6	3,36	Multiplet	2	6	55,8
11	2,36	Multiplet	2	9	174,3
12	1,72	Multiplet	2	11	31,2
13	1,57	Multiplet	2	12	25,2
14	2,21	Multiplet	2	13	29,2
16	2,12	Singulet	1	14	18,8
19	2,56	Multiplet	2	15	85,6
20	3,23	Multiplet	2	16	57,2
De 28 à 42	6,90-8,11	Multiplet	13	17	177,9
45 et 46	3,67	Singulet	6	19	30,8
				20	30,5
				21	178,4
				24	35,3
				De 25 à 42	De 108,2 à 160,1 (8 pics)
				45 et 46	88,1

Table 30 Attribution RMN de l'acide 4-((3S,5R)-5-((diméthoxytrityloxy)méthyl)-1-(6-heptynoyl)-3-pyrrolidinoyloxy)-4-oxobutanoïque 43

3.2.1.2 Synthèse du linker 28 : le *N*-((2*R*,3*R*)-1,3-dihydroxy-2-butanyl)-6-heptynamide

Pour la synthèse de ce second linker, le composé de départ utilisé, commercialement disponible, est le thréoninol. Ce composé répond à toutes les conditions nécessaires expliquées précédemment au paragraphe 3.2.1. Pour rappel, il possède un alcool primaire, un alcool secondaire et il présente, sur son centre asymétrique, une fonction amine qui peut être facilement fonctionnalisée pour y introduire une fonction alcyne. Le schéma de synthèse réalisé pour obtenir ce second linker est décrit dans la figure 60.

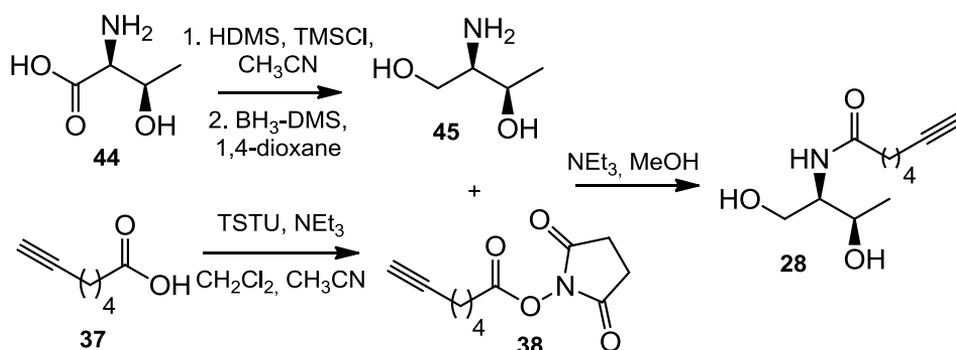


Fig. 60 Synthèse du linker 28 : le *N*-((2*R*,3*R*)-1,3-dihydroxy-2-butanyl)-6-heptynamide

Cette voie de synthèse est identique à celle utilisée en second lieu pour le linker 27, expliquée dans le paragraphe 3.2.1.1.

La première étape, l'étape de réduction, a été réalisée en utilisant le complexe BH₃-DMS. Le composé 45 est obtenu quantitativement. La réduction par NaBH₄/I₂ est aussi testée mais les rendements obtenus sont nettement moins bons.

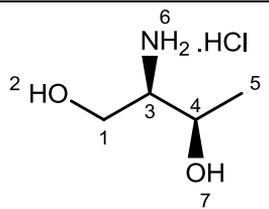
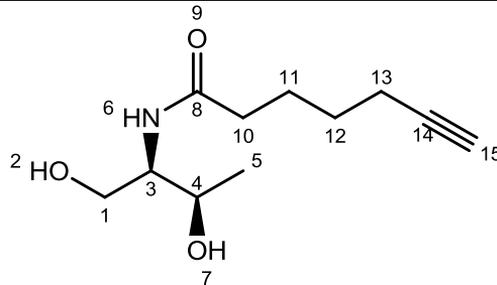
						
¹ H	δ(ppm)	Multiplicité	Intégration	J (Hz)	¹³ C	δ(ppm)
1a	3,49	Doublet de doublet	1	6,8 et 11,3	1	54,8
1b	3,65	Doublet de doublet	1	5,1 et 11,3	3	61,0
3	2,69	Doublet de triplet	1	5,1 et 6,8	4	65,8
4	3,73-3,82	Multiplet	1		5	16,5
5	1,19	Doublet	3	6,5		

Table 31 Attribution RMN du (2R,3R)-thréoninol hydrochloré **45**

En parallèle, l'acide 6-heptynoïque **37** a été couplé avec le TSTU pour donner l'acide activé correspondant **38**, cette synthèse a été décrite dans le paragraphe 3.2.1.1. L'acide activé a alors été couplé au (2R,3R)-thréoninol hydrochloré **45**. Cette étape a été réalisée en présence de triéthylamine dans du méthanol.

						
¹ H	δ(ppm)	Multiplicité	Intégration	J (Hz)	¹³ C	δ(ppm)
1	3,69	Doublet	2	4,7	1	55,1
3	3,78	Multiplet	1		3	63,9
4	4,08-4,15	Multiplet	1		4	67,6

5	1,14	Doublet	3	6,3	5	18,2
6	6,62	Doublet	1	8,4	8	174,7
10	2,26	Triplet	2	7,5	10	36,1
11	1,72	Doublet de triplet	2	7,5 et 15,3	11	25,0
12	1,52	Doublet de triplet	2	7,0 et 15,3	12	28,0
13	2,18	Triplet de doublet	2	2,5 et 7,0	13	20,3
15	1,94	Triplet	1	2,5	14	84,2
					15	68,9

Table 32 Attribution RMN du linker 28 : le N-((2R,3R)-1,3-dihydroxy-2-butanyl)-6-heptynamide

Ce linker **28** doit également subir la modification de ces deux fonctions alcool pour être directement utilisable au départ de la synthèse de la chaîne oligonucléotidique. Ces deux étapes sont également les mêmes que celles décrites précédemment.

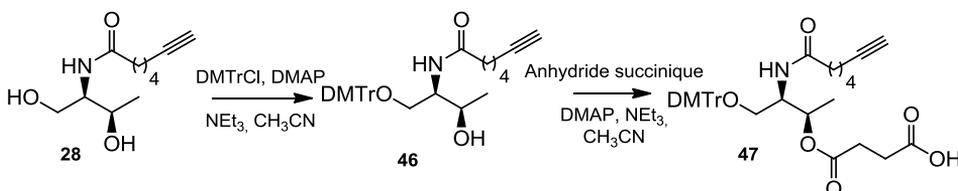
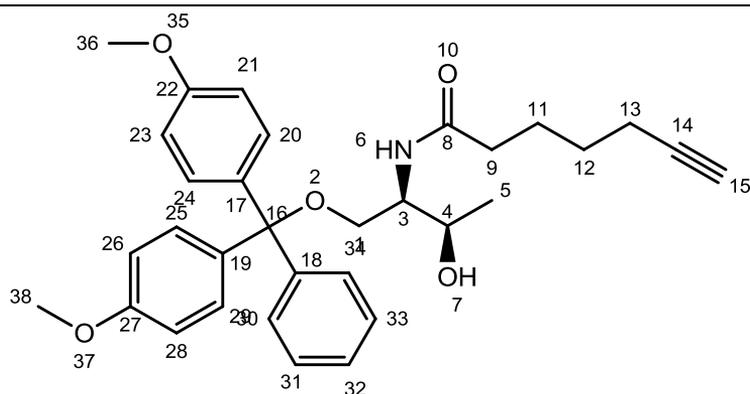


Fig. 61 Synthèse de N-(2R,3R)-1-diméthoxytrytyloxy-3-succinoyl-2-butanyl-6-heptynamide 47

La première étape est la protection de l'alcool primaire par du chlorure de diméthoxytrytyle. Le rendement de cette réaction est faible, de l'ordre de 25%.

Résultats et discussions



¹ H	δ(ppm)	Multiplicité	Intégration	¹³ C	δ(ppm)
1a	3,31	Doublet de doublet (J = 4 et 8 Hz)	1	1	53,4
1b	3,34	Doublet de doublet (J = 4 et 8 Hz)	1	3	64,6
3	4,01	Multiplet	1	4	67,6
4	4,13	Multiplet	1	5	17,9
5	1,17	Doublet (J=6,4Hz)	3	8	172,8
6	6,30	Doublet (J= 8,8 Hz)	1	9	35,8
9 et 13	2,24	Multiplet	4	11	24,6
11	1,81	Multiplet	2	12	27,6
12	1,59	Multiplet	2	13	19,8
15	1,99	Singulet	1	14	83,7
De 20 à 34	6,87-7,46	Multiplet	13	15	68,6
36 et 38	3,77	Singulet	6	16	86,4
				36 et 38	54,8

	De 17 à 34	De 113,0 à 158,1 (8 pics)
--	---------------	------------------------------

Table 33 Attribution RMN du N-(((2R,3R)-1-diméthoxytrityloxy)-3-hydroxy-2-butanyl)-6-heptynamide 46

La dernière étape, pour l'obtention du composé **47**, est la réaction entre l'anhydride succinique et l'alcool secondaire. Le rendement de cette réaction, également faible, est de 15%.

Le composé **47** pourra se coupler directement au support solide et donc être le point de départ de la synthèse d'un oligonucléotide.

La suite de notre travail s'effectue uniquement autour du linker **27** et de son dérivé le composé **43**. Ce dernier a été couplé à un support solide et, à partir de cet ensemble, un siRNA a pu être synthétisé. Le marquage via chimie click a également été réalisé. Ces différentes étapes sont expliquées dans les paragraphes suivants.

¹ H	δ(ppm)	Multiplicité	Intégration	¹³ C	δ(ppm)
1, 12 et 13	3,07-3,32	Multiplet	6	1	54,0
3 et 4	3,97-3,99	Multiplet	2	3	63,4
5	1,07	Doublet (J=5Hz)	3	4	69,9
17	2,26-2,32	Multiplet	2	5	17,2
18	1,70-1,79	Multiplet	2	8	176,0
19	1,52-1,57	Multiplet	2	10	173,8
20	2,15-2,20	Multiplet	2	12	47,6
22	2,17	Singulet	1	13	40,2
De 27 à 41	6,85-7,44	Multiplet	13	14	178,3
43 et 45	3,77	Singulet	6	17	36,4
				18	26,2
				19	29,2
				20	18,8
				21	84,7
				22	70,7
				23	87,4
				De 24 à 41	De 108,1 à 160,1 (8 pics)
				43 et 45	55,8

Table 34 Attribution RMN du linker 47: l'acide 4-((2R,3R)-4-(diméthoxytrityloxy)-3-(6-heptyn)amido-2-butanyloxy)-4-oxobutanoïque

3.2.2 Synthèse d'un siRNA modifié par le linker 27

Le composé **43**, l'acide 4-((3S,5R)-5-((diméthoxytrityloxy)méthyl)-1-(6-heptynoyl)-3-pyrrolidinyloxy)-4-oxobutanoïque, a été utilisé pour modifier un siRNA. Comme décrit dans la figure 62, le composé **43** a été couplé à un support solide, une résine porteuse d'une fonction amine. Ensuite, le brin sens et le brin antisens du siRNA ont été synthétisés, respectivement, à partir du support solide modifié par notre composé **43** et d'un support solide normal. Les deux brins ont finalement été couplés l'un à l'autre. La synthèse complète du siRNA double brin **50** modifié par notre linker **27** a été réalisée chez Eurogentec (Parc Scientifique, Seraing, Belgique).

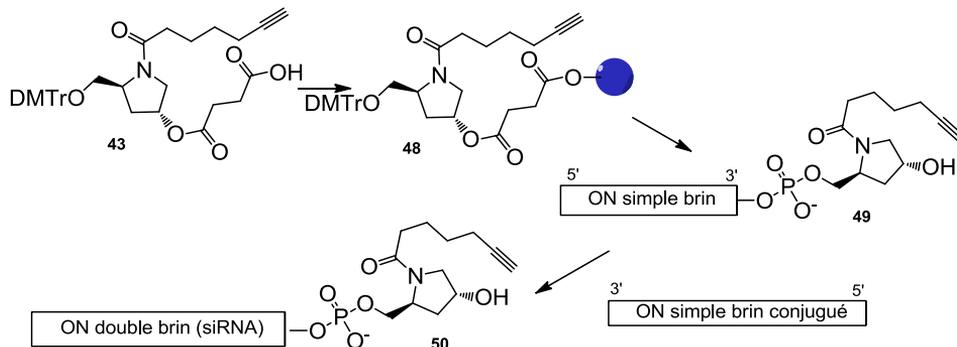


Fig. 62 Synthèse du siRNA double brin 50 modifié à l'aide du linker 27 (ON = oligonucleotide)

La séquence oligonucléotidique choisie, précédemment étudiée par Garbaki et son équipe, est la suivante : 5'-UCACUUACAGGAUCUAUAA-3' (brin sens) et 5'-UUAUAGAUCUGUAAGUGA-3' (brin antisens). (96, 138)

3.2.3 Radiochimie

Le siRNA double brin **50** modifié avec notre linker **27** porteur d'un groupement alcyne a été couplé, par une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen, avec un groupe prosthétique marqué au fluor-18 et porteur d'une fonction azoture. (Fig. 63) Le synthon choisi est le 1-(azidométhyl)-4- ^{18}F fluorobenzène [^{18}F]**26** (Fig. 54). Ce dernier a été mis au point dans notre laboratoire. (73) Pour vérifier la bonne formation du [^{18}F]siRNA [^{18}F]**51**, il faudra le comparer à sa référence froide **51**. La synthèse de cette référence a donc été la première étape de cette partie du travail.

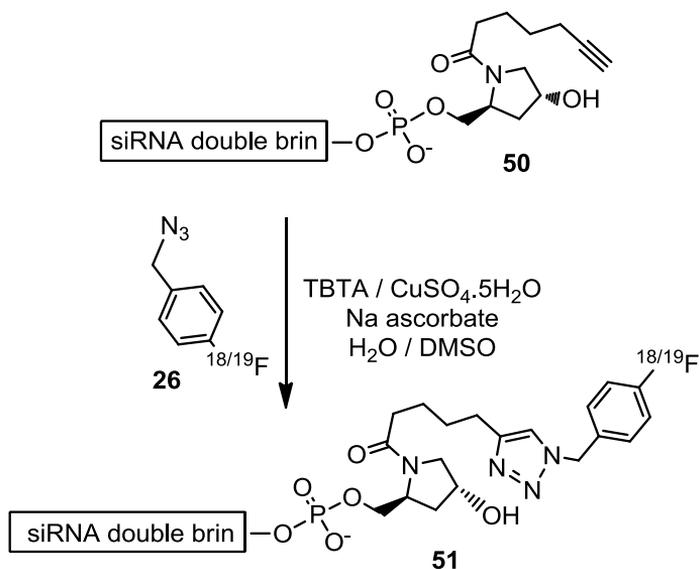


Fig. 63 Synthèse du [^{18}F]siRNA clické [^{18}F]**51** la référence froide **51**

3.2.3.1 Synthèse de la référence froide

Le 1-(azidométhyl)-4-fluorobenzène **26**, synthétisé selon la méthode de Demko et Sharpless (139), a été clické à notre siRNA double brin **50** modifié avec notre linker porteur du groupement alcyne. (Fig. 63)

Comme décrits dans la littérature, différents mélanges de solvants (eau, dioxane, DMSO, t-BuOH,...) avec un excès d'ascorbate de sodium et un complexe Cu(II)/TBTA sont généralement utilisés dans les réactions de chimie click avec les oligonucléotides. (101, 140, 141)

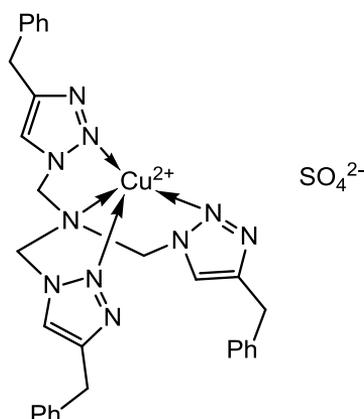


Fig. 64 Structure du complexe Cu(II)/TBTA

Pour cette réaction, une solution du synthon azoture, un excès d'un complexe Cu(II)/TBTA et de l'ascorbate de sodium dans une solution eau/DMSO ont donc été ajoutés au siRNA double brin **50**. (96) Après purification par HPLC semipréparative et lyophilisation, le siRNA **51** a été obtenu. Les masses moléculaires du siRNA double brin **50** et du produit de click **51** ont été déterminées par spectroscopie ESI-Q-ToF ou MALDI-ToF soit au CART-LSM (ULg, Liège, Belgique) soit chez Eurogentec (Seraing, Belgique). Le tableau suivant reprend les résultats obtenus. La réaction de cycloaddition s'étant correctement déroulée sur le siRNA, la

masse de ce dernier a augmenté de 151, ce qui correspond bien à la masse molaire du 1-(azidométhyl)-4-fluorobenzène **26**.

Composé	Masse (m/z)
Brin sens	6885
Brin sens clické	7036
Brin antisens	6656
SiRNA double brin	13541
SiRNA double brin clické	13692

Table 35 Masse du siRNA et de ses différents composants

Le siRNA clické **51** a été analysé en HPLC analytique. Ce chromatogramme, représenté dans la figure 65, servira de référence lors de la radiosynthèse du [¹⁸F]siRNA clické [¹⁸F]**51**.

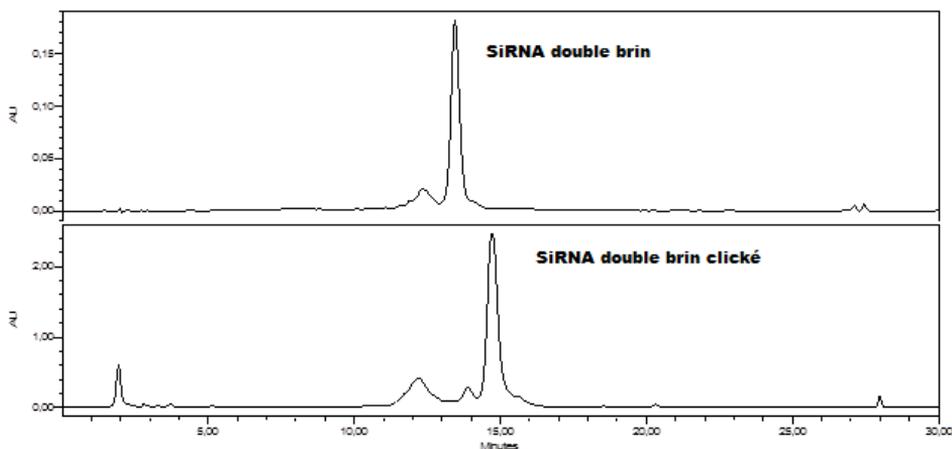


Fig. 65 Chromatogrammes HPLC analytique du siRNA double brin **50** et du siRNA double brin clické **51** avec le synthon 1-(azidométhyl)-4-fluorobenzène **26**

3.2.3.2 Synthèse du [¹⁸F]siRNA

La référence froide **51** obtenue, le siRNA marqué au fluor-18 [¹⁸F]**51** a été synthétisé. Pour ce faire, le siRNA modifié **50** a été clické avec le synthon 1-(azidométhyl)-4-[¹⁸F]fluorobenzène [¹⁸F]**26** obtenu selon la méthode développée dans notre laboratoire. (73) La radiosynthèse de ce groupement prosthétique a été complètement automatisée sur le FastLab, module de synthèse de chez GE Healthcare. Il a été obtenu avec un rendement radiochimique, corrigé de la décroissance (DC), de 84% en 45 minutes.

Après sa synthèse, le synthon [¹⁸F]azoture a été trappé sur une cartouche OASIS HLB LP+ et élué avec une solution de DMSO et d'éther diéthylique 0,5/5,5 en volume. L'éther a ensuite été éliminé par évaporation sous un flux d'azote et le synthon, en solution dans le DMSO, a directement été couplé au siRNA modifié **50**.

La réaction de click a été effectuée avec un large excès de complexe Cu(II)/TBTA et d'ascorbate de sodium dans un milieu eau/DMSO. (Fig. 63) Cette réaction a déjà été testée dans notre centre par Frédéric Mercier avec un siRNA modifié par un autre linker (96). Mais dans notre cas, pour un rendement radiochimique similaire à celui obtenu durant la recherche de F. Mercier, la quantité de siRNA utilisée est réduite d'un facteur 10. Ce qui représente un incroyable avantage quand on considère le coût élevé de synthèse de ces siRNAs.

La réaction est suivie par HPLC analytique, et par comparaison avec la référence froide, on voit que le [¹⁸F]siRNA est bien synthétisé.

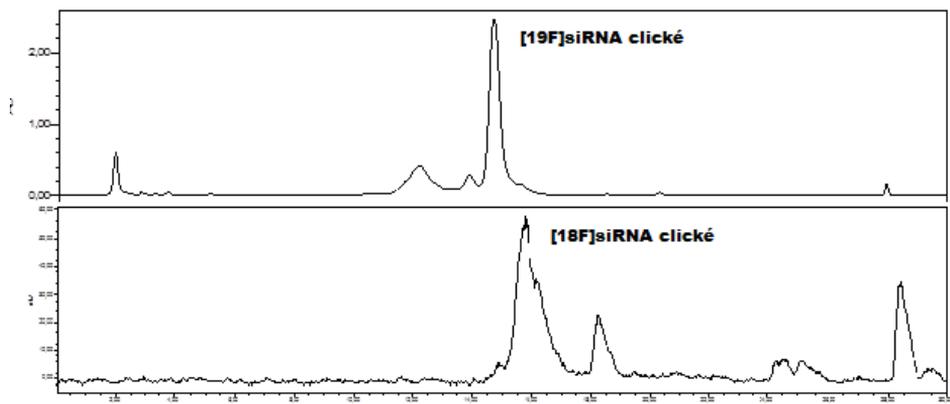


Fig. 66 Chromatogrammes HPLC analytique du $[^{18}\text{F}]$ siRNA clické $[^{18}\text{F}]$ 51 et de sa référence froide 51

Le $[^{18}\text{F}]$ siRNA clické $[^{18}\text{F}]$ 51 a été purifié par HPLC semipréparative, dilué dans de l'eau et trappé sur une cartouche Sep-Pak tC18 plus, élué avec de l'éthanol et finalement transféré sur une cartouche contenant un gel de filtration (NAP10® Sephadex G-25). Le $[^{18}\text{F}]$ siRNA $[^{18}\text{F}]$ 51 a enfin été élué avec une solution physiologique pour être obtenu dans une solution injectable. La radiosynthèse globale (la synthèse du synthon 1-(azidométhyl)-4- $[^{18}\text{F}]$ fluorobenzène, la réaction click, la purification par HPLC et la formulation) dure 120 minutes et le rendement radiochimique corrigé de la décroissance est de 12%. Au départ de cette radiosynthèse +/- 150 mCi (5550 MBq) de $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ sont utilisés pour obtenir +/- 8 mCi (296 MBq) de $[^{18}\text{F}]$ siRNA $[^{18}\text{F}]$ 51 après les 120 minutes de synthèse. Utiliser une activité de départ plus élevée donnerait également de bon résultats, une radiosynthèse similaire a été réalisée par F. Mercier au départ de 700 mCi (25,9 GBq) de $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ pour obtenir +/- 70 mCi (2,6 GBq) de $[^{18}\text{F}]$ siRNA. (96)

Dans cette seconde partie du travail, nous avons donc synthétisé deux linkers, et grâce à l'un d'eux nous avons réussi à marquer un siRNA avec un atome de fluor-18. Une nouvelle méthode de marquage de siRNA a donc été développée. La table 36 reprend les différents rendements obtenus lors de la synthèse des linkers ainsi que les rendements et le temps nécessaires au deux radiosynthèses.

Composé synthétisé	Rendement	Temps
Linker 27	60%	-
Linker 43	3%	-
Linker 28	50%	-
Linker 47	3%	-
1-(azidométhyl)-4- [¹⁸ F]fluorobenzène [¹⁸F]26	84%	45 minutes
[¹⁸ F]siRNA [¹⁸F]51	12%	120 minutes

Table 36 Récapitulatif: rendement et temps des (radio)synthèses

4 Conclusions

Pour résumer ce travail, nous pouvons dire que nous avons développé deux nouvelles méthodes de marquage de biomolécules.

La première est le marquage spécifique d'une tyrosine. La méthode a été développée en utilisant comme tyrosine la N-acétyl tyrosine méthylamide. Cette nouvelle technique pourrait être appliquée également pour le marquage de tyrosine contenue dans un peptide ou dans une protéine. Ces recherches sont d'ailleurs en cours dans notre laboratoire.

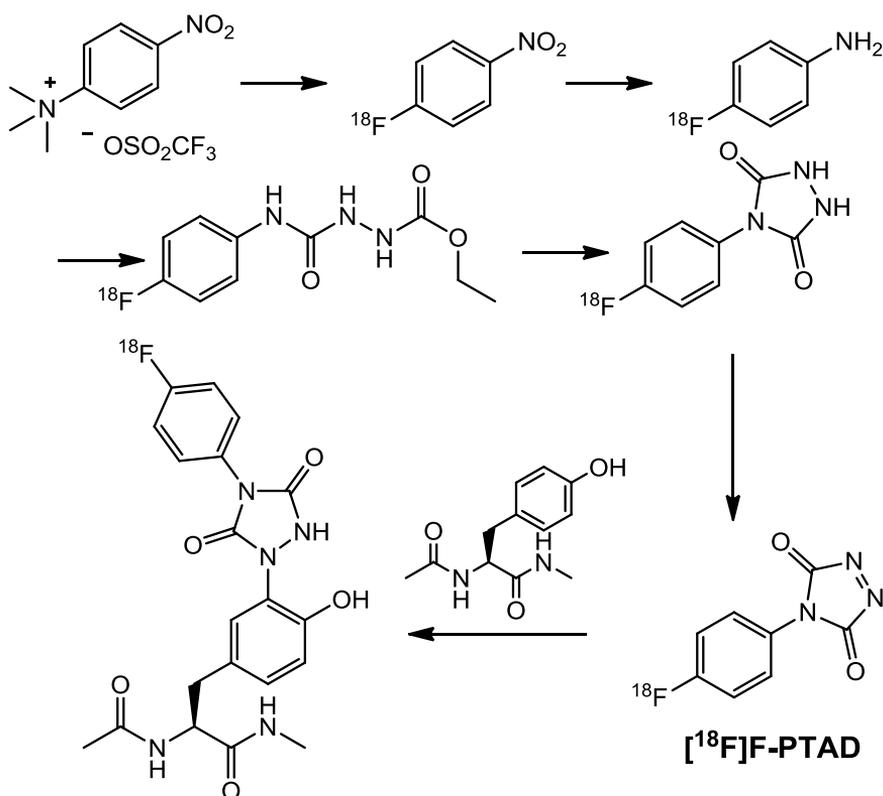


Fig. 67 Synthèse du $[^{18}\text{F}]\text{F-PTAD}$ et couplage avec la N-acétyl tyrosine méthylamide

Lors de cette technique de marquage, le [^{18}F]F-PTAD est couplé à une tyrosine. Le rendement radiochimique (DC) global (pour la synthèse du [^{18}F]F-PTAD, le couplage avec le peptide et la purification par HPLC) est de 20%. Le temps de cette radiosynthèse est de 2h30. Nous avons publié les résultats de cette recherche dans la littérature. (142) (Annexe 1)

La deuxième technique de marquage développée lors de ce travail s'applique aux siRNAs. Deux linkers porteurs d'une fonction alcyne ont été synthétisés.

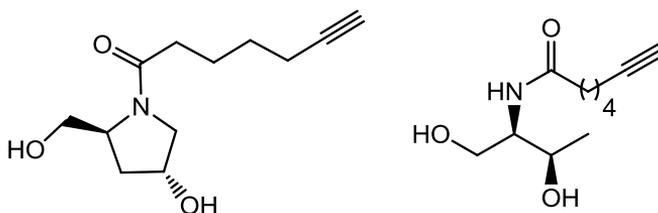


Fig. 68 Linkers: le (2S,4R)-N-(6-heptynoyl)-4-hydroxy prolinol et le N-((2R,3R)-1,3-dihydroxy-2-butanyl)-6-heptynamide

A partir de ces linkers, n'importe quel siRNA peut être synthétisé. Une fois les siRNA modifiés par nos linkers obtenus, ils peuvent être couplés par une cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen à un synthon porteur d'un fluor-18. Dans cette recherche, nous avons utilisé le 1-(azidométhyl)-4- ^{18}F fluorobenzène.

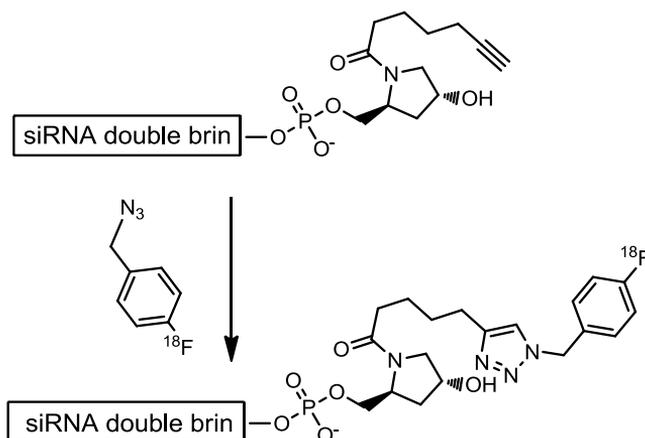


Fig. 69 Synthèse d'un siRNA marqué au fluor-18

La radiosynthèse globale (la synthèse du synthon 1-(azidométhyl)-4-[¹⁸F]fluorobenzène, la réaction click, la purification par HPLC et la formulation) dure 120 minutes et le rendement radiochimique (DC) est de 12%. Nous avons publiés les résultats de cette recherche dans la littérature. (143) (Annexe 2)

Dans des études futures, il serait intéressant de comparer la stabilité *in vivo* des différents siRNAs modifiés avec les différents linkers, leur métabolisation et leur pharmacocinétique.

Les deux méthodes de marquage développées au cours de ce travail peuvent être qualifiées d'universelles. Pour la première, le [¹⁸F]F-PTAD pourra être couplé à une tyrosine, peu importe son environnement. Pour la deuxième méthode, le fait de synthétiser le siRNA à partir du linker montre bien qu'elle peut être applicable à n'importe quel siRNA ou séquence oligonucléotidique.

5 Matériel et méthodes

5.1 Généralités

Les TLC ont été effectuées sur des plaques de silice Macherey-Nagel Polygram SIL G/UV₂₅₄ en utilisant la lumière UV comme agent de détection. Les analyses TLC des composés [¹⁸F]fluorés sont réalisées sur un scanner Bioscan modèle AR2000.

La chaîne HPLC se compose d'une pompe (Waters 616) et d'un détecteur UV à barrettes de diodes (PDA Waters 996), les longueurs d'onde situées entre 198 et 300 nm sont enregistrées continuellement, le tout est contrôlé par le programme Empower®. Les activités sont mesurées avec un détecteur à scintillation (NaI).

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre Brücker Avance DRX-400 (¹H à 400 MHz et ¹³C à 100 MHz), les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm) en utilisant le tétraméthylsilane comme référence interne ($\delta=0$). Les abréviations employées sont les suivantes: s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet.

Les produits de départ et les réactifs proviennent généralement des firmes Aldrich ou Acros. Ils ont été achetés dans leur qualité commerciale la plus élevée et ont été utilisés sans purification supplémentaire, sauf indication contraire. Les cartouches Sep-Pak utilisées en radiochimie proviennent de la firme Waters.

Les [¹⁸F]fluorures sont obtenus en bombardant de protons de l'eau enrichie en oxygène-18, la réaction nucléaire est la suivante : $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$.

5.1.1 Spécificité pour le marquage de la tyrosine

Les analyses HPLC analytiques ont été réalisées sur une colonne Waters Xbridge® C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) avec un flux de 1mL/min. Durant la radiosynthèse, les analyses HPLC analytiques ont été réalisées avec les conditions suivantes (grad1) : CH₃CN/H₂O, linéaire 5 min de 5/95 à 15/85, linéaire 15 min de 15/85 à 50/50 et le nettoyage linéaire 10 min de 50/50 à 90/10. Les analyses HPLC semipréparatives ont été réalisées sur une colonne Xbridge® C18 (10 x 250 mm ; 5 µm) avec un flux de 5 mL/min et en utilisant les conditions suivantes (grad2) : CH₃CN/H₂O, linéaire 30 min de 5/95 à 25/75 et linéaire 5 min de 25/75 à 50/50.

5.1.2 Spécificité pour le marquage de siRNA

Les TLC ont été révélées aux UVs, à l'aide d'iode ou par traitement thermique après vaporisation d'une solution éthanolique contenant 5% d'anisaldéhyde et 5% d'acide sulfurique concentré.

Les chromatographies sur colonne ont été réalisées sur silicagel Acros (0,035 - 0,07mm). Les analyses HPLC analytiques ont été effectuées sur une colonne SYMMETRY® C18 (3,9 x 150 mm ; 5 µm). Les HPLC préparatives ont été réalisées sur une colonne NOVASEP de type LC50.500.VE150 (diamètre interne de 50 mm) avec comme phase interne de la Kromasil®. Pour le siRNA, les analyses HPLC analytiques ont été réalisées sur une colonne Jupiter Proteo 90Å de chez Phenomenex (150 x 4,6 mm) avec un flux de 1mL/min à température ambiante et utilisant un gradient avec les conditions suivantes : A=TEAA 0,1 M (pH 7,4) dans H₂O/CH₃CN : 19/1, v/v ; B= MeOH. Le gradient est le suivant : 100% A pendant 1 min, linéaire 30 min de 10/0 à 2/8 (A/B) et le nettoyage 6 min à 100% B. La détection s'effectue à 254 nm. Les

analyses semipréparatives HPLC ont été réalisées sur une colonne Jupiter Proteo 90Å de chez Phenomenex (250 x 10 mm) avec un flux de 4mL/min et le même gradient que pour les HPLC analytiques.

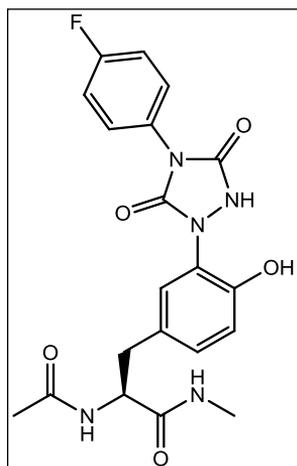
Les analyses LC-MS ont été effectuées sur un appareil TSQ 7000 Thermoquest Finnigan équipé d'une source electrospray ou NANOElectrospray. Les analyses de spectroscopie de masse des siRNA ont été effectuées sur un appareil Q-TOF Ultima Global avec une source ESI au CART-LSM (ULg) ou sur un appareil MALDI-TOF chez Eurogentec (Seraing, Belgique).

Les points de fusion ont été enregistrés sur un appareil Büchi Melting Point B-545.

5.2 Marquage de tyrosine

5.2.1 Synthèse des précurseurs et références froides

(S)-2-acétamido-3-(4-hydroxy-3-(4-(4-fluorophényl)-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidin-1-yl)phényl)-N-méthylpropanamide 3

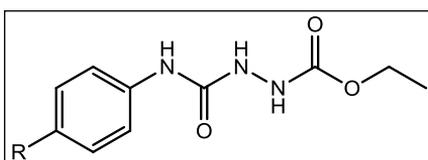


A une solution de N-acétyl tyrosine méthylamide **2** (500 mg, 2,11 mmol, 1 éq) dans un mélange tampon $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7 100 mM (50mL) – CH_3CN (50mL), ajouter à température ambiante une solution 0,5 M en F-PTAD **1** (448 mg, 2,32 mmol, 1,1 éq) dans de l'acétonitrile. Agiter la solution à température ambiante pendant 30 minutes. Acidifier le mélange réactionnel avec de l'HCl 12M (8mL) et le concentrer sous vide. Purifier le résidu

brut obtenu sur colonne de silice ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$, 9/1, v/v) pour obtenir le composé désiré (450 mg, 50%) sous forme d'un solide légèrement rosé.

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d^6): 1,77 (s, 3H), 2,53 (d, 3H, $J=4\text{Hz}$), 2,61-2,66 (dd, 1H, $J=8\text{Hz}$, $J=12\text{Hz}$), 2,83-2,87 (dd, 1H, $J=4\text{Hz}$, $J=12\text{Hz}$), 4,28-4,34 (m, 1H, $J=4\text{Hz}$, $J=4\text{Hz}$, $J=8\text{Hz}$), 6,69 (d, 1H, $J=8\text{Hz}$), 6,84 (d, 1H, $J=8\text{Hz}$), 7,26 (t, 2H, $J=8\text{Hz}$), 7,58 (dd, 2H, $J=4\text{Hz}$, $J=8\text{Hz}$), 7,70 (s, 1H), 7,98 (d, 1H(NH), $J=4\text{Hz}$), 8,16 (d, 1H(NH), $J=4\text{Hz}$). RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d^6): 22,7, 25,5, 37,3, 54,6, 115,1 (d, $J=23\text{Hz}$), 117,2, 121,6, 125,1, 127,5 (d, $J=9\text{Hz}$), 128,2, 130,6, 149,8, 153,0, 159,7 (d, $J=236\text{Hz}$), 162,2, 166,2, 169,1, 171,7.

***p*-nitro-4-phényl-1-carbéthoxysemicarbazide 5a (R=NO₂) / *p*-fluoro-4-phényl-1-carbéthoxysemicarbazide 5b (R=F) / *p*-diméthylamino-4-phényl-1-carbéthoxysemicarbazide 10 (R=NMe₂) / *p*-benzyloxy-4-phényl-1-carbéthoxysemicarbazide 15 (R=OCH₂C₆H₅)**



Ajouter goutte à goutte l'isocyanate correspondant (25 mmol, 1 éq) à une solution de carbazate d'éthyle (25 mmol, 1 éq) dans du

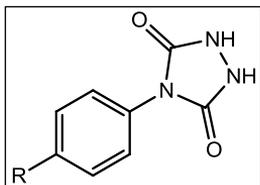
toluène sec (100 mL). Agiter la réaction à température ambiante pendant 2h puis à 80°C pendant 2h. Filtrer le précipité formé puis sécher le sous vide pour obtenir le semicarbazide correspondant (>90%). ***p*-nitro-4-phényl-1-carbéthoxysemicarbazide 5a (R=NO₂)** RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d^6): 1,17-1,23 (t, 3H, $J=7,5\text{Hz}$), 4,03-4,11 (q, 2H, $J=7,5\text{Hz}$), 7,74-7,76 (d, 2H, $J=8\text{Hz}$), 8,16-8,18 (d, 2H, $J=8\text{Hz}$), 8,39 (s, 1H), 9,04 (s, 1H), 9,52 (s, 1H). RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d^6): 14,6, 60,7, 117,7, 125,0, 141,1, 146,5, 155,1, 156,9. ***p*-fluoro-4-phényl-1-carbéthoxysemicarbazide 5b (R=F)** RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d^6): 1,16-1,22 (t, 3H, $J=7,5\text{Hz}$), 4,01-4,10 (q, 2H, $J=7,5\text{Hz}$), 7,04-7,11 (t, 2H, $J=8\text{Hz}$), 7,44-7,50 (dd, 2H, $J=4\text{Hz}$, $J=8\text{Hz}$), 8,02 (s, 1H), 8,76 (s, 1H), 8,91 (s, 1H). RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d^6): 15,1, 61,0, 115,4-115,6 ($J=22\text{Hz}$), 120,7, 136,5, 156,2, 156,6-159,0 ($J=237\text{Hz}$), 157,4. ***p*-**

diméthylamino-4-phényl-1-carbéthoxysemicarbazide 10 (R=NMe₂)

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d⁶): 1,18-1,21 (t, 3H, J=8Hz), 2,82 (s,6H), 4,03-4,08 (q, 2H, J=8Hz), 6,68-6,68 (d, 2H, J=8Hz), 7,24-7,26 (d, 2H, J=8Hz), 7,80 (s, 1H), 8,34 (s, 1H), 8,85 (s, 1H). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d⁶): 15,0, 41,2 60,9, 113,5, 120,8, 130,0, 146,9, 156,3, 157,5. **p-benzyloxy-4-phényl-1-carbéthoxysemicarbazide 15 (R=OCH₂C₆H₅)**

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d⁶): 1,17-1,21 (t, 3H, J=8Hz), 4,03-4,08 (q, 2H, J=8Hz), 6,90-6,92 (d, 2H, J=8Hz), 7,34-7,44 (m, 7H), 7,90 (s, 1H), 8,53 (s, 1H), 8,88 (s, 1H). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d⁶): 14,5, 60,5, 69,4, 114,8, 120,2, 127,6, 127,8, 128,4, 133,0, 137,3, 153,5, 155,8, 157,0.

4-(4-nitrophényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione 6a (R=NO₂) / 4-(4-fluorophényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione 6b (R=F) / 4-(4-diméthylaminophényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione 11 (R=NMe₂) / 4-(4-benzyloxyphényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione 16 (R=OCH₂C₆H₅)

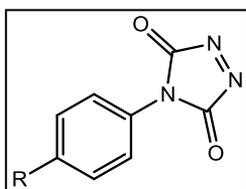


Ajouter, dans une solution de KOH 4M, le semicarbazide correspondant. Chauffer la suspension à 50°C jusqu'à dissolution complète. Après retour à température ambiante, acidifier la

solution avec de l'HCl concentré. Filtrer le précipité blanc obtenu et le sécher sous vide. **4-(4-nitrophényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione 6a (R=NO₂)** RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d⁶): 7,88-7,90 (d, 2H, J=8Hz), 8,33-8,35 (d, 2H, J=8Hz), 10,80 (s, 2H). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d⁶): 124,1, 125,5, 138,1, 145,5, 152,3. **4-(4-fluorophényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione 6b (R=F)** RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d⁶): 7,36-7,41 (t, 2H, J=8Hz), 7,54-7,58 (dd, 2H, J=4Hz, J=8Hz), 10,50 (s, 2H). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d⁶): 116,0-116,2 (J=22Hz), 128,7, 140,2, 153,7, 160,2-162,6 (J=243Hz). **4-(4-diméthylaminophényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione 11 (R=NMe₂)** RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d⁶): 2,91 (s, 6H), 6,74-

6,76 (d, 2H, $J=8\text{Hz}$), 7,18-7,20 (d, 2H, $J=8\text{Hz}$). RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d^6): 40,7, 112,5, 120,9, 127,4, 149,8, 154,7. **4-(4-benzyloxyphényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione 16** ($\text{R}=\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$) RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d^6): 5,15 (s, 2H), 7,08-7,11 (d, 2H, $J=12\text{Hz}$), 7,31-7,48 (6, 7H), 10,38 (s, 2H). RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d^6): 69,9, 115,4, 125,1, 128,0, 128,1, 128,3, 129,0, 137,3, 154,2, 158,0.

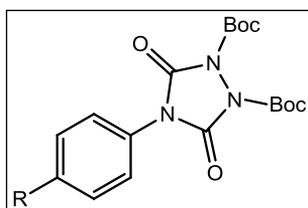
4-(4-fluorophényl)-3H-1,2,4-triazole-3,5(4H)-dione 1 (R=F) / 4-(4-nitrophényl)-3H-1,2,4-triazole-3,5(4H)-dione 7 (R=NO₂)



Dans une solution du composé 1,2,4-triazolidine-3,5-dione correspondant (0,5 mmol, 1,1 éq) dans de l'acétonitrile (1 ml), ajouter de la pyridine (0,4 mmol, 1 éq) et de la N-bromosuccinimide (0,4 mmol, 1 éq).

Agiter la solution pendant 5 minutes. Observer la formation du composé triazole par le changement de coloration du blanc au rouge de la solution.

4-(4-nitrophényl)-1,2-di-tert-butoxycarbonyl-1,2,4-triazolidine-3,5-dione 8a (R=NO₂) / 4-(4-fluorophényl)-1,2-di-tert-butoxycarbonyl-1,2,4-triazolidine-3,5-dione 8b (R=F) / 4-(4-diméthylaminophényl)-1,2-di-tert-butoxycarbonyl-1,2,4-triazolidine-3,5-dione 12 (R=NMe₂) / 4-(4-benzyloxyphényl)-1,2-di-tert-butoxycarbonyl-1,2,4-triazolidine-3,5-dione 17a (R=OCH₂C₆H₅)

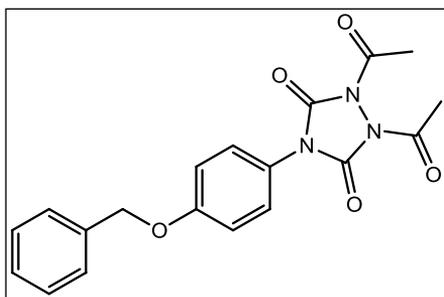


Dans une solution du composé 1,2,4-triazolidine-3,5-dione correspondant (6,75 mmol, 1 éq) dans du dichlorométhane sec, ajouter du DMAP (1,35 mmol, 0,2 éq). Ajouter ensuite le Boc₂O (16,8 mmol, 2,5 éq) à cette

solution goutte à goutte. Agiter le mélange pendant une nuit puis évaporer. Ajouter du méthanol sur le résidu pour faire apparaître un

précipité blanc. Filtrer ce dernier et le sécher pour obtenir le composé désiré (65%). **4-(4-nitrophényl)-1,2-di-tert-butoxycarbonyl-1,2,4-triazolidine-3,5-dione 8a (R=NO₂)** RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d⁶): 1,53 (s, 18H), 7,79-7,81 (d, 2H, J=8Hz), 8,34-8,36 (d, 2H, J=8Hz). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d⁶): 27,2, 87,3, 124,8, 126,0, 136,8, 147,1, 150,2, 150,6, 154,1. **4-(4-fluorophényl)-1,2-di-tert-butoxycarbonyl-1,2,4-triazolidine-3,5-dione 8b (R=F)** RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d⁶): 1,62 (s, 18H), 7,17-7,22 (t, 2H, J=8Hz), 7,45-7,48 (dd, 2H, J=4Hz, J=8Hz). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d⁶): 27,8, 87,1, 116,3-116,1 (J=23Hz), 125,8, 128,0-128,1 (J=8Hz), 146,2, 146,6, 161,2-163,7 (J=248Hz). **4-(4-diméthylaminophényl)-1,2-di-tert-butoxycarbonyl-1,2,4-triazolidine-3,5-dione 12 (R=NMe₂)** RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d⁶): 1,59 (s, 18H), 2,98 (s, 6H), 6,72-6,74 (d, 2H, J=8Hz), 7,21-7,23 (d, 2H, J=8Hz). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d⁶): 27,8, 40,4, 86,6, 112,3, 118,0, 127,0, 146,5, 147,3, 150,7. **4-(4-benzyloxyphényl)-1,2-di-tert-butoxycarbonyl-1,2,4-triazolidine-3,5-dione 17a (R=OCH₂C₆H₅)** RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d⁶): 1,61 (s, 18H), 5,11 (s, 2H), 7,06-7,08 (d, 2H, J=8Hz), 7,35-7,43 (m, 7H). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d⁶): 27,8, 70,2, 86,7, 115,4, 122,6, 127,4, 127,5, 128,1, 128,6, 136,3, 146,3, 147,0, 159,0.

1,2-diacétyl-4-(4-(benzyloxy)phényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione 17b

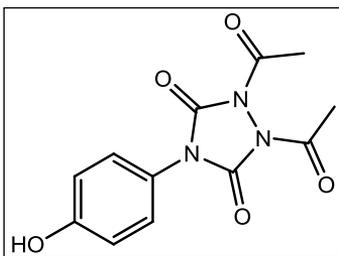


Dans une solution du 4-(4-benzyloxyphényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione **16** (500 mg, 1,76 mmol, 1 éq) dans du dichlorométhane sec, ajouter du DMAP (65 mg, 0,63 mmol, 0,3 éq). Ajouter ensuite le Ac₂O (835 µL, 8,83 mmol, 5 éq) à cette solution goutte à goutte. Agiter le mélange pendant une nuit puis évaporer. Ajouter du méthanol sur le résidu pour

faire apparaître un précipité blanc. Filtrer ce dernier et le sécher pour obtenir le composé désiré (420 mg, 65%). RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d^6): 1,62 (s, 2H), 2,66 (s, 6H), 7,08-7,10 (d, 2H, $J=8\text{Hz}$), 7,31-7,33 (d, 2H, $J=8\text{Hz}$), 7,35-7,44 (m, 5H). RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d^6): 24,9, 71,1, 116,5, 122,8, 128,2, 128,5, 129,0, 129,5, 137,0, 148,7, 160,2, 165,7.

1,2-diacétyl-4-(4-hydroxyphényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione

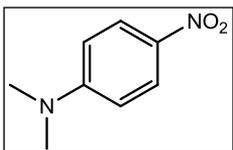
18b



Mettre le 1,2-diacétyl-4-(4(benzyloxy)phényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione **17b** (400 mg, 1,1 mmol, 1 éq) en solution dans du THF (10 mL) et agiter deux jours sous une pression en H_2 de 3 bars en présence d'une quantité catalytique de Pd/C (46 mg, 0,3 mmol, 0,2

éq). La réaction terminée, évaporer le solvant et purifier le résidu sur une colonne de silice (toluène/ MeOH 4/1, v/v) pour obtenir une huile incolore du composé désiré **18b** (217 mg, 70%). TLC (toluène/MeOH 4/1, v/v): R_f = 0,35. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d^6): 2,46 (s, 6H), 6,86-6,88 (d, 2H, $J=8\text{Hz}$), 7,27-7,29 (d, 2H, $J=8\text{Hz}$). RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d^6): 24,0, 116,0, 128,7, 129,3, 149,4, 158,5, 165,3.

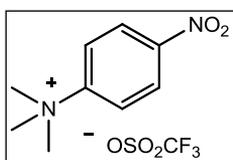
N,N-diméthyl-4-nitroaniline **25**



Ajouter une solution de 4-nitroaniline **24** (2g, 14,4 mmol, 1 éq) dans du THF (25 mL), sous atmosphère inerte (N_2), à du NaH (60% en suspension dans une huile minérale (0,74 g, 31 mmol, 2,1 éq). Agiter le mélange pendant 5 minutes à température ambiante sous atmosphère d'azote. Ajouter ensuite une solution d'iodométhane (5,048 g, 35 mmol, 2,5 éq) dans du THF (25 mL). Après 24h d'agitation à température ambiante, verser le mélange dans de l'eau froide, laver deux fois avec de

l'acétate d'éthyle. Combiner les phases organiques, les laver avec du brine, les sécher sur Na_2SO_4 et les concentrer sous vide pour obtenir un solide orange. Le recristalliser dans de l'éther de pétrole 40-60 avec quelques gouttes d'acétate d'éthyle pour obtenir des cristaux oranges (1,67 g, 70%). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): 3,11 (s, 6H), 6,59-6,61 (d, 2H, $J=8\text{Hz}$), 8,10-8,12 (d, 2H, $J=8\text{Hz}$). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 40,3, 110,2, 126,1, 136,9, 154,2.

N,N,N-triméthyl-4-nitrobenzenammonium triflate **21**



Ajouter le trifluorométhanesulfonate de méthyle (4,64 mL, 42 mmol, 2 éq) à une solution de N,N-diméthyl-4-nitroaniline **25** (3,5 g, 24 mmol, 1 éq) dans du dichlorométhane (20 mL). Agiter le mélange pendant

24h à température ambiante sous atmosphère inerte (N_2). Après réaction, diluer le mélange avec de l'éther éthylique pour obtenir un solide rouge. Le filtrer et le recristalliser deux fois dans du dichlorométhane pour obtenir un solide légèrement jaune (3,70 g, 47%). RMN ^1H (400 MHz, $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$): 4,03 (s, 9H), 8,52 (m, 4H). RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$): 57,1, 121,3 (q, $J=320\text{Hz}$), 122,8, 125,4, 149,1, 151,9.

5.2.2 Radiochimie

5.2.2.1 Radiosynthèse du [^{18}F]F-PTAD

Les [^{18}F]fluorures, initialement contenus dans l'eau de rinçage de la cible et des lignes en provenance du cyclotron, ont été piégés sur une cartouche Sep-Pak QMA light. Ceux-ci ont été élués, dans un récipient conique, avec 700 μL d'une solution $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 50/50 contenant 8 mg de K_2CO_3 et 26 mg de Kryptofix 222. Le récipient a été transféré dans un four à 120°C . Après une minute, un flux d'azote vient favoriser l'évaporation. Après quatre minutes supplémentaires, 3 portions de 150

μL d'acétonitrile ont été ajoutées pour éliminer les dernières traces d'eau par formation d'un azéotrope. Une solution de 10 mg de précurseur, le triflate de N,N,N-triméthyl-4-nitrobenzenammonium **21**, dans 1 mL de DMSO a été ajoutée au complexe $\text{K}^{[18\text{F}]}\text{-K}_{222}$ précédemment formé. Le mélange a été chauffé à 100°C pendant 8 minutes. Analyse radio-TLC (acétate d'éthyle/hexane, 1/1, v/v) : R_f ($[^{18}\text{F}]$ fluorures) = 0, R_f ($[^{18}\text{F}]$ 4-fluoronitrobenzène **[^{18}F]22**) = 0,8. Analyse HPLC (grad 1) : t_R = 22 min. Conversion radiochimique calculée à l'aide de la TLC : $91\pm 4\%$ ($n>10$).

Le milieu de marquage a été dilué avec 10 mL d'eau et l'activité a été piégée sur une cartouche Sep-Pak C18 environnementale préalablement activée avec 10 mL d'acétonitrile et rincée avec 10 mL d'eau. Le $[^{18}\text{F}]$ 4-fluoronitrobenzène **[^{18}F]22** a été rincé sur la cartouche avec 10 mL d'eau pour éliminer toute trace d'impureté et surtout le précurseur de départ. L'élution s'effectue à l'aide de 2 mL de méthanol dans un récipient contenant 3 mg de Pd/C et 25 mg de NaBH_4 . Le mélange a été agité 5 min à température ambiante. Analyses radio-TLC (acétate d'éthyle/hexane, 1/1, v/v) : R_f ($[^{18}\text{F}]$ 4-fluoroaniline **[^{18}F]23**) = 0,4. Analyses HPLC (grad 1) : t_R = 14 min. Rendement radiochimique corrigé de la décroissance (DC) : $80\pm 6\%$ ($n>10$).

Le milieu de réduction a été dilué avec 10 mL d'eau. Le catalyseur a été éliminé après passage de la solution sur un filtre contenant de la fibre de verre (Millex). L'activité a été piégée sur une cartouche Sep-Pak tC18 environnementale préalablement activée avec 10 mL d'acétonitrile et rincée avec 10 mL d'eau. La cartouche a été séchée grâce à un flux d'azote pendant 5 minutes. La $[^{18}\text{F}]$ 4-fluoroaniline **[^{18}F]23** a été éluée avec 2,5 mL de dichlorométhane sec dans un récipient contenant 10 mg de triphosgène. Ce dernier est refroidi à 0°C et 20 μL de triéthylamine sont été ajoutés. Le mélange a été agité pendant 5 minutes avant

l'addition de 40 mg de carbazate d'éthyle. Le tout a été agité 10 minutes à 0°C pour obtenir le [^{18}F]p-fluoro-4-phényl-1-carbéthoxysemicarbazide [^{18}F]**5b**. Analyse radio-TLC (acétate d'éthyle/hexane, 1/1, v/v) : R_f ([^{18}F]p-fluoro-4-phényl-1-carbéthoxysemicarbazide [^{18}F]**5b**) = 0,1. Analyse HPLC (grad 1) : t_R = 15 min. Conversion radiochimique calculée à l'aide de l'HPLC: $80\pm 10\%$ (n=9).

Le dichlorométhane a été évaporé et 500 μL d'une solution aqueuse de KOH 4M ont été ajoutés au résidu. Le mélange a été agité pendant 5 minutes puis neutralisé avec 500 μL d'une solution aqueuse d'HCl 6M pour obtenir le produit de cyclisation, le [^{18}F]4-(4-fluorophényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione [^{18}F]**6b**. Analyse radio-TLC (acétate d'éthyle/hexane, 1/1, v/v) : R_f ([^{18}F]4-(4-fluorophényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione [^{18}F]**6b**) = 0,02. Analyse HPLC (grad 1) : t_R = 4 min. Rendement radiochimique (DC) pour l'étape de couplage et l'étape de cyclisation : $65\pm 5\%$ (n=7).

Le milieu de réaction a été dilué dans 10 mL d'eau et l'activité a été piégée sur une cartouche Sep-Pak tC18⁺ short préalablement activée avec 10 mL d'acétonitrile et rincée avec 10 mL d'eau. Le [^{18}F]4-(4-fluorophényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione [^{18}F]**6b** a été élué avec 1 mL d'acétonitrile. 100 μL d'une solution de pyridine dans l'acétonitrile (0,3 M) suivi de 100 μL d'une solution de N-bromosuccinimide dans l'acétonitrile (0,3 M) ont été ajoutés à la solution contenant le [^{18}F]4-(4-fluorophényl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione [^{18}F]**6b** pour obtenir le [^{18}F]4-(4-fluorophényl)-1,2,4-triazole-3,5-dione ([^{18}F]F-PTAD) [^{18}F]**1**.

5.2.2.2 Couplage entre le [^{18}F]F-PTAD et la N-acétyl tyrosine méthylamide

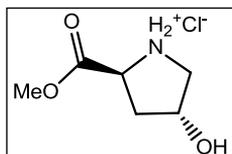
La solution brute obtenue à la fin de la radiosynthèse du [^{18}F]F-PTAD [^{18}F]**1** a directement été utilisée sans aucune purification. Celle-ci a été ajoutée à 1 mL d'une solution de N-acétyl tyrosine méthylamide **2** (1 mg dans 0,9 mL de tampon phosphate 100 mM pH = 7 (ou tampon Tris 100 mM pH = 7)). La solution a été agitée à température ambiante pendant 30 minutes pour obtenir le [^{18}F]-(*S*)-2-acétamido-3-(4-hydroxy-3-(4-(4-hydroxyphényl)-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidin-1-yl)phényl)-N-méthylpropanamide [^{18}F]**3**. Analyse radio-TLC (acétate d'éthyle/hexane, 1/1, v/v) : R_f ([^{18}F]-(*S*)-2-acétamido-3-(4-hydroxy-3-(4-(4-hydroxyphényl)-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidin-1-yl)phényl)-N-méthylpropanamide) [^{18}F]**3** = 0,2. Analyse HPLC (grad 1) : t_R = 9 min. La pureté radiochimique est de $43\pm 6\%$ (n=5).

Le ([^{18}F]-(*S*)-2-acétamido-3-(4-hydroxy-3-(4-(4-hydroxyphényl)-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidin-1-yl)phényl)-N-méthylpropanamide [^{18}F]**3** est purifié par HPLC semipréparative (grad 2) : t_R = 12 min. Le composé purifié est analysé par HPLC analytique pour confirmer sa pureté chimique et radiochimique. Le rendement radiochimique (DC) global pour la synthèse du [^{18}F]F-PTAD, le couplage avec la N-acétyl tyrosine méthylamide et la purification en HPLC semipréparative, est de 20 % pour une durée de 2h30.

5.3 Marquage de siRNA

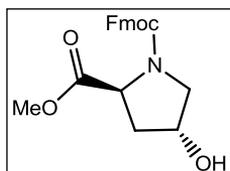
5.3.1 Synthèse des linkers

Chlorure de (2S,4R)-4-Hydroxy-2-(méthoxycarbonyl) pyrrolidinium **30**



Ajouter à 0°C du chlorure de thionyle (5,48 mL, 76,2 mmol, 1 éq) à une solution de trans-4-hydroxy-L-proline **29** (10 g, 76,2 mmol, 1 éq) dans du méthanol sec (150 mL). Agiter le mélange à température ambiante jusqu'à dissolution complète de l'acide aminé. Concentrer la solution sous pression réduite et éliminer les dernières traces de chlorure de thionyle par co-évaporation avec du dichlorométhane pour obtenir le produit désiré **30** sous forme d'un solide blanc (13,3 g, 96%). Point de fusion : 159-161°C. ESI-MS (ES⁺): m/z = 146 (M⁺-Cl) (100%). RMN ¹H (400 MHz, D₂O): 2,27 (m, 1H), 2,49 (m, 1H), 3,36 (m, 1H), 3,52 (m, 1H), 3,83 (s, 3H), 4,64-4,72 (m, 2H). RMN ¹³C (100 MHz, D₂O): 36,6, 53,4, 53,8, 58,1, 69,3, 170,1.

Ester méthylique dérivé de l'acide (2S,4R)-N-(fluoren-9-ylméthoxycarbonyl)-4-hydroxypyrrolidine-2-carboxylique **31**

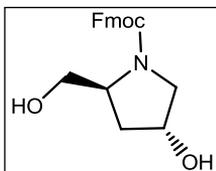


Ajouter du N-(Fluoren-9-ylméthoxycarbonyl) succinimide (24,2 g, 72 mmol, 1 éq) dans du dioxane (100 mL) à une solution aqueuse de carbonate de sodium 9% (100 mL) contenant le chlorure de (2S,4R)-4-Hydroxy-2-(méthoxy carbonyl) pyrrolidinium **30** (13 g, 72 mmol, 1 éq). Agiter le mélange à température ambiante pendant une nuit. Le diluer dans 100 mL d'eau et laver avec de l'acétate d'éthyle (3 x 100 mL). Acidifier la phase aqueuse avec de l'acide chlorhydrique concentré et extraire de nouveau avec de l'acétate d'éthyle (2 x 100 mL).

Sécher la phase organique sur MgSO_4 anhydre, filtrer et concentrer sous pression réduite. Purifier sur colonne de silice (Eluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 19:1, v/v) pour obtenir le produit désiré **31** sous forme d'une huile incolore (19,3 g, 60%). TLC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 19:1, v/v) : $R_f = 0,33$; HPLC analytique ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 6:4 v/v, 1mL/min): $t_R = 2,7$ min ; ESI-MS (ES+): $m/z = 368$ $[\text{M}+1]^+$ (100%), $m/z = 390$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (70%), $m/z = 431$ $[\text{M}+\text{Na}+\text{CH}_3\text{CN}]^+$ (40%); RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): 2,14 (m, 1H), 2,35 (m, 1H), 3,57 (d, $J = 11,8$ Hz, 1H), 3,69 (dd, $J = 6,8$ Hz, 11,8 Hz, 1H), 3,77 (s, 3H), 4,18 (t, $J = 6,2$ Hz, 1H), 4,28 (t, $J = 6,8$ Hz, 1H), 4,35 - 4,57 (m, 3H), 7,33 (m, 2H), 7,42 (m, 2H), 7,60 (m, 2H), 7,79 (m, 2H). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 39,3, 47,2, 52,5, 55,3, 58,0, 67,8, 70,1, 120,0, 125,1, 127,1, 127,8, 141,3, 144,9, 155,0, 173,2.

(2S,4R)-N-(fluoren-9-ylméthoxycarbonyl)-4-hydroxy prolinol

32

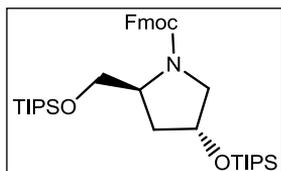


Procédure A : Dans un ballon contenant du borohydrure de sodium (1,33 g, 34,7 mmol, 4 éq) dans 50 mL de THF sec sous agitation, ajouter l'ester méthylique dérivé de l'acide (2S,4R)-N-(fluoren-9-ylméthoxycarbonyl)-4hydroxypyrrolidine-2-carboxylique **31** (3,2 g, 8,6 mmol, 1 éq). Ajouter ensuite goutte à goutte une solution d'iode (3,3 g, 13 mmol, 1,5 éq) dans 25 mL de THF sous atmosphère inerte et à 0°C sur une période de 30 min. Agiter le mélange à reflux pendant une nuit. Quand la solution est revenue à température ambiante, ajouter du méthanol goutte à goutte à la suspension blanche jusqu'à dissolution complète. Acidifier la solution avec de l'acide chlorhydrique concentré jusqu'à un pH de 2-3. Filtrer le précipité et concentrer le filtrat et purifier le résidu sur colonne de silice (Eluant : 100% acétate d'éthyle). Rassembler les différentes fractions contenant le produit, les évaporer et

co-évaporer avec de l'éthanol pour obtenir le produit désiré **32** sous forme d'un solide blanc (1,4 g, 45%).

Procédure B : A une solution d'ester méthylique dérivé de l'acide (2S,4R)-N-(fluoren-9-ylméthoxycarbonyl)-4-hydroxypyrrolidine-2-carboxylique **31** (0,5 g, 1,3 mmol, 1 éq) dans un mélange THF/EtOH 3/5, ajouter du NaBH₄ (0,103 g, 2,6 mmol, 2 éq) et du LiCl (0,115 g, 2,7 mmol, 2 éq) sous atmosphère inerte et à 0°C. Agiter la solution à température ambiante pendant une nuit. Ensuite, ajouter de l'acide chlorhydrique 1 M jusqu'à obtenir un pH de 7. Extraire le composé avec de l'acétate d'éthyle. Sécher la phase organique sur MgSO₄ et évaporer le solvant sous pression réduite. Purifier le résidu sur colonne de silice (Eluant : 100% acétate d'éthyle) pour obtenir, après évaporation, le produit désiré **32** sous forme d'un solide blanc (0,25 g, 56%). Point de fusion: 123,6-124,4°C. TLC (acétate d'éthyle 100%): R_f = 0,1 ; HPLC analytique (CH₃CN/H₂O 6:4, 1 mL/min) : t_R = 1,8 min ; ESI-MS (ES⁺): m/z = 340 [M+1]⁺ (100%) ; RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): 1,73 (m, 1H), 2,00 (m, 1H), 3,40 (m, 1H), 3,53 (m, 1H), 3,64 (m, 1H), 3,69 (m, 1H), 4,14 (m, 1H), 4,19 (m, 1H), 4,34 (m, 1H), 4,38 (m, 2H), 7,28 (m, 2H), 7,38 (m, 2H), 7,56 (m, 2H), 7,74 (m, 2H) ; RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): 37,4, 47,2, 55,6, 59,3, 66,1, 67,7, 69,2, 120,0, 125,1, 127,1, 127,8, 141,4, 143,9, 157,2.

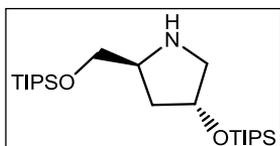
(2S,4R)-(9H-fluoren-9-yl)méthyl-4-((triisopropylsilyl)oxy)-2-(((triisopropylsilyl)oxy)méthyl)pyrrolidine-1-carboxylate 33



Ajouter du chlorure de triisopropylsilyle (2,34 mL, 11 mmol, 3 éq) à une solution de (2S,4R)-N-(fluoren-9-ylméthoxycarbonyl)-4-hydroxy prolinol **32** (1,88 g, 3,6 mmol, 1 éq) et d'imidazole (0,75 g, 11 mmol, 3 éq) dans du dichlorométhane (50 mL). Agiter le mélange

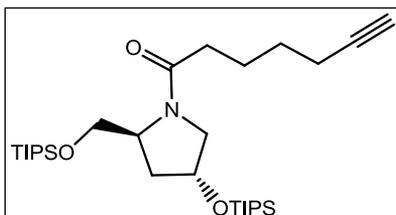
pendant une nuit à 0°C. Le verser dans de l'eau et extraire avec de l'éther diéthylique (2 x 50 mL). Sécher la phase organique sur MgSO₄ anhydre, filtrer et concentrer sous vide. Obtenir le composé désiré **33** sous forme d'une huile jaune (3,1 g, 90%) après purification sur colonne de silice (Eluant: hexane/acétate d'éthyle 19:1, v/v). TLC (Hexane/Acétate d'éthyle 19:1, v/v) R_f = 0,18; ESI-MS (ES⁺): m/z = 430 [M-Fmoc]⁺ (100%), m/z = 652 [M+1]⁺ (70%). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): 0,9 (d, J = 7,1 Hz, 36H), 1,26 (m, 6H), 2,08 (m, 1H), 2,24 (m, 1H), 3,45 (m, 1H), 3,56 (m, 1H), 3,65 (m, 1H), 3,70 (m, 1H), 4,05 (m, 1H), 4,23 (m, 1H), 4,35 (m, 1H), 4,65 (m, 2H), 7,20 (m, 2H), 7,39 (m, 2H), 7,60 (m, 2H), 7,74 (m, 2H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): 12,1, 17,9, 37,7, 47,5, 55,8, 58,5, 64,2, 67,1, 70,2, 120,1, 125,2, 127,1, 127,7, 141,4, 144,4, 155,1.

(2S,4R)-4-((triisopropylsilyl)oxy)-2-(((triisopropylsilyl)oxy)-méthyl)pyrrolidine **34**



Traiter le (2S,4R)-(9H-fluoren-9-yl)méthyl-4-((triisopropylsilyl)oxy)-2-(((triisopropylsilyl)oxy)méthyl)pyrrolidine-1-carboxylate **33** avec une solution de THF contenant 20% de pipéridine à température ambiante pendant 1h. Evaporer le solvant pour obtenir un solide blanc directement utilisable pour l'étape suivante sans purification supplémentaire. ESI-MS (ES⁺): m/z = 430 [M+1]⁺ (100%)

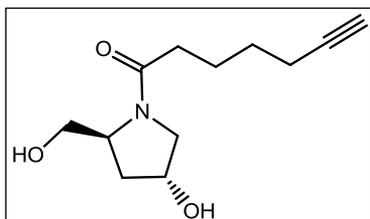
1-((2S,4R)-4-((triisopropylsilyl)oxy)-2-(((triisopropylsilyl)oxy)-méthyl)pyrrolidin-1-yl)hept-6-yn-1-one **35**



Dissoudre l'acide 6-heptynoïque (0,28 mL, 2,3 mmol, 1 éq) dans du DMF (5 mL) et l'ajouter à une solution d'HBTU (1,28 g, 3,4 mmol, 1,5 éq) dans du CH₂Cl₂ (3 mL). Ajouter de la DIEA (1,2 mL, 6,9 mmol, 3

éq) à la solution et agiter le tout à température ambiante pendant deux heures. Ajouter le (2S,4R)-4-((triisopropylsilyl)oxy)-2-(((triisopropylsilyl)oxy)-méthyl)pyrrolidine **34** (2 g, 4,6 mmol, 2 éq) et agiter le mélange à température ambiante pendant une nuit. Diluer dans de l'eau et extraire avec de l'acétate d'éthyle (2 x 100 mL). Sécher la phase organique sur Na₂CO₃, filtrer et évaporer sous pression réduite. Purifier le résidu sur colonne de silice (Eluant: acétate d'éthyle/hexane 4:1, v/v) pour obtenir le produit désiré **35** sous forme d'une huile jaune (1,6 g, 61%). TLC (acétate d'éthyle/hexane 4:1, v/v): R_f = 0,5, ESI-MS (ES⁺): m/z = 538 [M+1]⁺ (100%), m/z = 560 [M+Na]⁺ (10%). RMN ¹H (400MHz, CDCl₃): 1,02 (d, J=7,3Hz, 36H), 1,16 (m, J=7,3Hz, 6H), 1,57 (m, 2H), 1,72 (m, 2H), 1,89 (s, 1H), 1,92-2,21 (m, 6H), 3,28 (m, 1H), 3,61 (d, J=8Hz, 2H), 4,05 (m, 1H), 4,27 (m, 1H), 4,68 (m, 1H). RMN ¹³C : 12,0, 17,9, 18,1, 24,0, 28,3, 34,4, 37,2, 56,3, 57,8, 63,7, 67,3, 71,0, 84,3, 171,4.

(2S,4R)-N-(6-heptynoyl)-4-hydroxy prolinol **27**



Procédure A: Dissoudre le 1-((2S,4R)-4-((triisopropylsilyl)oxy)-2-(((triisopropylsilyl)oxy)méthyl) pyrrolidin-1-yl)hept-6-yn-1-one **35** (100 mg, 0,19 mmol, 1 éq) dans une solution 1,7 M d'acide

chlorhydrique dans le méthanol. (Pour préparer cette solution, faire buller du HCl gazeux dans du méthanol. Pour former le HCl gazeux, ajouter goutte à goutte de l'acide sulfurique concentré sur du NaCl solide.) Agiter le mélange à température ambiante pendant 4h. Ajouter ensuite du NaHCO₃ solide à la solution pour neutraliser l'acidité. Evaporer le solvant sous pression réduite et purifier le résidu sur colonne de silice (Eluant: CH₂Cl₂/MeOH 9:1, v/v) pour obtenir le produit **27** sous forme d'un solide blanc (15 mg, 35%).

Procédure B: Dissoudre l'hydrochlorure de (2S,4R)-4-hydroxyprolinol **36** (695 mg, 4,5 mmol, 1 éq) dans du méthanol sec (15 mL) contenant de la triéthylamine (681 mg, 6,75 mmol, 1,5 éq) et la solution est agitée pendant 15 minutes à température ambiante. Ajouter l'acide activé 1-(6-heptynoyl)pyrrolidine-2,5-dione **38** (500 mg, 2,25 mmol, 0,5 éq) et agiter le milieu de réaction pendant 1h30. Purifier le résidu obtenu après évaporation du solvant sur colonne de silice (Eluant: CH₂Cl₂/MeOH 9:1, v/v) pour obtenir le produit **27** sous forme d'un solide blanc (304 mg, 60%).

Procédure C: Ajouter l'hydrochlorure de (2S,4R)-4-hydroxyprolinol **36** (170 mg, 1,1 mmol, 1 éq) et de la triéthylamine (700 µL, 5 mmol, 4,5 éq) à une solution d'acide activé 1-(2-thioxothiazolidine-3-yl)hept-6-yn-1-one **39** (228 mg, 1 mmol, 0,9 éq) dans du THF (5 mL). Agiter le mélange réactionnel jusqu'à disparition complète de la couleur jaune, signe de la présence de l'acide activé dans le milieu (1h30). Après évaporation et purification sur colonne de silice (Eluant: acétate d'éthyle/MeOH 9:1, v/v), obtenir le produit **27** sous forme d'un solide blanc (76 mg, 34 %).

Procédure D: Ajouter l'hydrochlorure de (2S,4R)-4-hydroxyprolinol **36** (51 mg, 0,33 mmol, 1 éq) et de la triéthylamine (100 µL, 0,7 mmol, 2,2 éq) à une solution d'acide activé pentafluorophényl hept-6-ynoate **40** (106 mg, 0,36 mmol, 1,1 éq) dans du dichlorométhane (5 mL). Agiter le mélange pendant 20h, concentrer sous pression réduite et purifier le résidu obtenu sur colonne de silice (Eluant : acétate d'éthyle/MeOH 9:1, v/v) pour obtenir le produit désiré **27** sous forme d'un solide blanc (10 mg, 13 %).

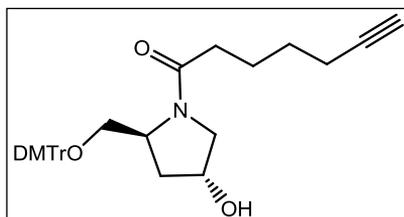
Procédure E: Mélanger l'hydrochlorure de (2S,4R)-4-hydroxyprolinol **36** (102 mg, 0,66 mmol, 1 éq) avec de la triéthylamine (280 µL, 1,4 mmol, 2,2 éq) dans du méthanol sec (5 mL). Agiter le tout pendant 15

minutes. Ajouter ensuite l'acide activé 1-(1*H*-1,2,3-benzotriazole-1-yl)hept-6-yn-1-one (160 mg, 0,66 mmol, 1 éq) et agiter le mélange réactionnel pendant 24h, concentrer sous pression réduite et purifier le résidu obtenu sur colonne de silice (Eluant : acétate d'éthyle/MeOH 9:1, v/v) pour obtenir le produit désiré **27** sous forme d'un solide blanc (23 mg, 15 %).

Point de fusion: 56,9-57,4°C. TLC (CH₂Cl₂/ MeOH 9:1, v/v): R_f = 0,3. ESI-MS (ES⁺): m/z = 226 [M+H]⁺. RMN ¹H (400MHz, CDCl₃) : 1,54-1,63 (m, 2H), 1,67-1,82 (m, 3H), 1,96 (m, 1H), 2,11 (m, 1H), 2,23 (m, 2H), 2,25-2,44 (m, 2H), 3,51-3,62 (m, 3H), 3,70 (m, 1H), 4,33 (m, 1H), 4,45 (m, 1H). RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) : 18,7, 24,3, 28,4, 35,2, 37,5, 56,7, 60,3, 66,9, 69,2, 69,5, 84,6, 175,0.

Crystallographic data: $a = 4.907(1) \text{ \AA}$, $b = 7.353(1) \text{ \AA}$, $c = 37.254(3) \text{ \AA}$, $V = 1344.2(3) \text{ \AA}^3$, orthorhombic, P2₁2₁2₁, Z = 4, MoK_α, $\mu = 0,089 \text{ mm}^{-1}$, $\rho = 1.202 \text{ g cm}^{-3}$, F(0 0 0) = 528, 5771 reflections (R_{int} = 0.0195) from which 1769 unique and 1639 observed ($I > 2\sigma(I)$), R₁ (all reflections) = 0.0484, R₁ (observed reflections) = 0.0443, wR₂ (observed reflections) = 0.1048, S = 1.110, residual density (ΔF) 0.181 and -0.145 e \AA^{-3} . Structure was solved and refined with the Shelxl package.

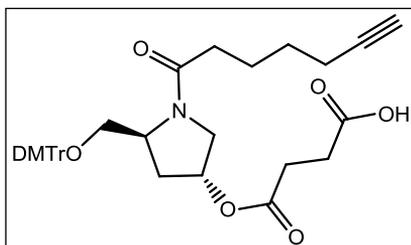
1-((2*S*,4*R*)-2-((diméthoxytrityloxy)méthyl)-4-hydroxy-1-pyrrolidiny)-1-(6-heptyn)one **42**



Ajouter de la triéthylamine (2,77 mL, 20 mmol, 2 éq), du DMAP (1,22 g, 10 mmol, 1 éq) et du DMTrCl (4,6 g, 13 mmol, 1,3 éq) à une solution de (2*S*,4*R*)-N-(6-heptynoyl)-4-hydroxy prolinol **27** (2,34 g, 10 mmol, 1 éq) dans de l'acétonitrile (20 mL). Agiter le mélange pendant une nuit à température ambiante. Evaporer le solvant et purifier

le résidu sur une colonne d'alumine (90 active neutral) (Eluant : toluène/acétone/ NEt_3 18:1:1 v/v/v) pour obtenir le produit désiré **42** sous forme d'une huile brune (830 mg, 15%). TLC (acétate d'éthyle 100%): $R_f = 0,35$; ESI-MS (ES^+): $m/z = 303$ [DMTrI^+] (100%), $m/z = 528$ [$\text{M}+1$]⁺ (10%), $m/z = 550$ [$\text{M}+\text{Na}$]⁺ (40%); $m/z = 566$ [$\text{M}+\text{K}$]⁺ (80%). RMN ^1H (400MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): 1,61 (m, 2H), 1,77 (m, 2H), 1,93 (s, 1H), 2,13 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,23 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,26 (m, 1H), 2,29 (m, 1H), 3,14 (m, 1H), 3,26 (m, 1H), 3,43 (m, 1H), 3,49 (m, 1H), 3,72 (m, 1H), 3,79 (s, 6H), 4,62 (m, 1H), 6,82 (m, 4H), 7,25 (m, 7H), 7,37 (m, 2H). RMN ^{13}C (100MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): 18,6, 24,4, 28,5, 34,8, 38,5, 55,5, 56,6, 63,8, 68,8, 69,3, 70,6, 84,4, 86,1, 113,4, 126,9, 128,0, 128,5, 129,4, 136,4, 145,3, 158,6, 171,3.

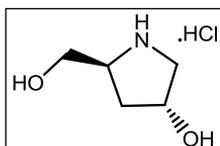
Acide 4-((3S,5R)-5-((diméthoxytrityloxy)méthyl)-1-(6-heptynoyl)-3-pyrrolidinyloxy)-4-oxobutanoïque **43**



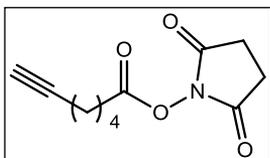
Dans un ballon, ajouter le 1-((2S,4R)-2-((diméthoxytrityloxy)méthyl)-4-hydroxy-1-pyrrolidinyloxy)-1-(6-heptyno)one **42** (700 mg, 1,3 mmol, 1 éq), de l'anhydride succinique (390 mg, 3,9 mmol, 3 éq), du DMAP (158 mg, 1,3 mmol, 1 éq) et de la triéthylamine (361 μL , 2,6 mmol, 2 éq) à 10 mL d'acétonitrile sec. Agiter le mélange à température ambiante pendant une nuit. Evaporer le solvant et purifier le résidu obtenu par HPLC préparative avec de la Kromasil® comme phase stationnaire (Eluant : $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 7:3 v/v; 60 mL/min) pour obtenir le produit désiré **43** sous forme d'une huile brune (214 mg, 26%). HPLC analytique: $t_R = 2,34$ min ($\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 7:3, 1 mL/min); ESI-MS (ES^+): $m/z = 303$ [DMTrI^+] (10%), $m/z = 628$ [$\text{M}+1$]⁺ (20%), $m/z = 650$ [$\text{M}+\text{Na}$]⁺ (15%), $m/z = 760$ [$\text{M}+\text{NEt}_3+\text{MeOH}$]⁺ (100%). RMN ^1H (400MHz, MeOD): 1,57 (m, 2H), 1,72 (m, 2H), 2,12 (s, 1H), 2,21

(m, 2H), 2,36 (m, 2H), 2,54 (m, 2H), 2,56 (m, 2H), 3,23 (m, 2H), 3,32 (m, 2H), 3,36 (m, 2H), 3,67 (s, 6H), 3,77 (m, 1H), 4,29 (m, 1H), 6,90 (m, 4H), 7,28 (m, 7H), 8,11 (m, 2H). RMN ^{13}C (100MHz, MeOD): 18,8, 25,2, 29,2, 30,5, 30,8, 31,2, 31,9, 35,3, 52,2, 55,8, 57,2, 57,8, 74,6, 85,6, 88,1, 108,2, 114,1, 127,8, 128,4, 129,2, 137,3, 146,4, 160,1, 174,3, 177,9, 178,4.

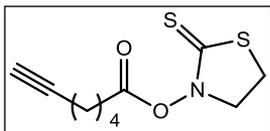
Hydrochlorure de (2S,4R)-4-hydroxyprolinol



Mettre la trans-4-hydroxy-L-proline **29** (5 g, 38 mmol, 1 équ) en suspension dans de l'acétonitrile (50 mL) et ajouter un mélange de hexaméthylsililane (26 mL, 120 mmol, 3,1 équ) et de chlorure de triméthylsilyle (1,3 mL, 7,6 mmol, 0,2 équ). Après agitation pendant 9h à reflux, filtrer le mélange et évaporer. Dissoudre l'huile jaune obtenue dans du dioxane (200 mL) sous atmosphère d'azote. Ensuite, ajouter du $\text{BH}_3\cdot\text{SMe}_2$ (19 mL, 200 mmol, 5,2 équ) au mélange. Agiter le tout pendant 10h à reflux. Après refroidissement à température ambiante, ajouter du HCl 1M (19 mL) goutte à goutte et chauffer le mélange à reflux pendant 1h. Evaporer le solvant et co-évaporer avec du méthanol contenant 1% de HCl concentré (3 x 150 mL) pour obtenir le produit sous forme d'un solide blanc (5,7 g, 96%). Point de fusion : 108,9-109,3 °C. ESI-MS (ES^+) : $m/z = 118$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. RMN ^1H (400MHz, CD_3OD) : 2,05 (m, 1H), 2,23 (m, 1H), 3,41 (dd, $J = 6,2$ Hz, 12,7 Hz, 1H), 3,53 (dd, $J = 3,8$ Hz, 12,7 Hz, 1H), 3,80 (dd, $J = 6,9$ Hz, 12,5 Hz, 1H), 4,01 (dd, $J = 3,5$ Hz, 12,5 Hz, 1H), 4,12 (m, 1H), 4,75 (m, 1H). RMN ^{13}C (100MHz, CD_3OD) : 36,7, 54,4, 61,6, 61,7, 71,1.

1-(6-heptynoyl)pyrrolidine-2,5-dione 38

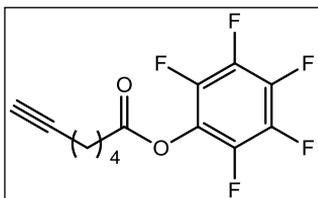
Dissoudre du TSTU (5,72 g, 19 mmol, 1,2 éq) dans de l'acétonitrile (50 mL) et ajouter cette solution à une solution d'acide 6-heptynoïque **37** (2 g, 16 mmol, 1 éq) et de triéthylamine (4,44 mL, 32 mmol, 2 éq) dans du CH₂Cl₂ (50 mL). Agiter le mélange réactionnel pendant 30 min à température ambiante. Diluer ensuite avec de l'acétate d'éthyle (100 mL), laver avec de l'eau (2 x 100 mL), du brine (75 mL), et sécher la phase organique sur du MgSO₄ anhydre. Evaporer le solvant pour obtenir le produit désiré **38** sous forme d'une huile jaune (3,76 g, 91%) Point de fusion: 62,9 – 63,5°C. (ES⁺) : m/z = 224 [M+H]⁺. RMN ¹H: (400MHz, CDCl₃): 1,55 - 1,66 (m, 2H), 1,79 - 1,88 (m, 2H), 1,94 (t, J = 2,6 Hz, 1H), 2,21 (td, J = 7,4 Hz, 2,6 Hz, 2H), 2,61 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 2,79 (m, 4H).

1-(2-thioxothiazolidine-3-yl)hept-6-yn-1-one 39

Ajouter du chlorure d'oxalyle (1,5 g, 12 mmol, 1,5 éq) et deux gouttes de DMF à une solution d'acide 6-heptynoïque **37** (1 g, 8 mmol, 1 éq) dans du toluène sec (10 mL). Agiter le mélange jusqu'à la fin du dégagement gazeux (3h). Evaporer le solvant et co-évaporer avec du toluène (2 x 25 mL). Diluer l'huile jaune obtenue dans du dichlorométhane sec (20 mL) et de la triéthylamine (2,4 g, 24 mmol, 3 éq). Ajouter de la thiazolidinéthione (TTH) (1,43 g, 12 mmol, 1,5 éq) et agiter le mélange pendant 3h. Laver la phase organique avec du brine (3 x 30 mL), la sécher sur MgSO₄ anhydre et évaporer le solvant. Purifier l'huile jaune obtenue sur colonne de silice (Eluant: CH₂Cl₂/acétate d'éthyle: 19/1, v/v) pour obtenir le produit désiré **39** sous forme d'une huile jaune (693 mg, 38%). (ES⁺) : m/z = 244 [M+H]⁺. TLC (CH₂Cl₂/acétate d'éthyle: 19/1): R_f = 0,9. RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃): 1,51 - 1,59 (m, 2H), 1,67 - 1,70 (m, 2H),

1,86 - 1,89 (m, 2H), 1,91 - 1,93 (m, 2H), 2,20 (s, 1H), 3,26 (t, $J = 5$ Hz, 2H), 4,54 (t, $J = 5$ Hz, 2H).

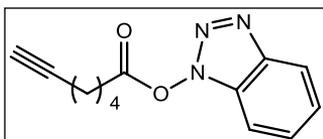
Pentafluorophényl hept-6-ynoate **40**



Ajouter du chlorure d'oxalyle (1,5 g, 12 mmol, 1,5 éq) et deux gouttes de DMF à une solution d'acide 6-heptynoïque **37** (1 g, 8 mmol, 1 éq) dans du toluène sec (10 mL).

Agiter le mélange jusqu'à la fin du dégagement gazeux (3h). Evaporer le solvant et co-évaporer avec du toluène (2 x 25 mL). Diluer l'huile jaune obtenue avec du dichlorométhane sec (20 mL). Ajouter le pentafluorophénol (1,4 g, 7,6 mmol, 0,95 éq) et refroidir le mélange à 0°C. Ajouter ensuite de la triéthylamine (1,6 g, 16 mmol, 2 éq) goutte à goutte et agiter le mélange à température ambiante. Après 1h30, diluer avec du dichlorométhane (50 mL). Laver la phase organique avec de l'acide chlorhydrique 0,1M (2 x 40 mL) et du brine (40 mL), la sécher sur Na₂SO₄ anhydre et évaporer le solvant. Purifier l'huile brune obtenue sur colonne de silice (Hexane/acétate d'éthyle: 4/1) pour obtenir le produit désiré **40** sous forme d'une huile incolore (725 mg, 31%). (ES⁺) : m/z = 293 [M+H]⁺. TLC (Hexane/acétate d'éthyle: 4/1): R_f = 0,73. RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃): 1,54 - 1,74 (m, 2H), 1,81 - 1,93 (m, 2H), 1,95 (t, $J = 2,7$ Hz, 1H), 2,25 (td, $J = 2,7$ Hz, 6,9 Hz, 2H), 2,69 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H).

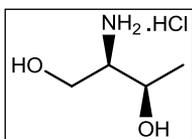
1-(1*H*-1,2,3-benzotriazole-1-yle)hept-6-yn-1-one **41**



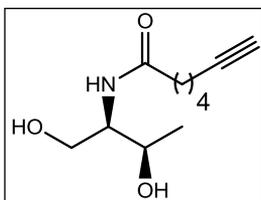
Ajouter du 1*H*-benzotriazole (1,9 g, 16 mmol, 4 éq) à une solution de chlorure de thionyle (476 mg, 4 mmol, 1 éq) dans du dichlorométhane sec (20 mL) et le mélange est agité pendant 30 minutes. Ajouter l'acide 6-heptynoïque **37** (504 mg, 4 mmol, 1 éq) et prolonger l'agitation pendant une nuit. Filtrer ensuite la solution et laver la

phase organique avec du NaOH 1M (3 x 50 mL) et du brine (30mL), la sécher avec du MgSO₄ anhydre et évaporer le solvant. Purifier le résidu sur colonne de silice (Eluant: Hexane/acétate d'éthyle: 4/1) pour obtenir le produit désiré **41** sous forme d'un solide blanc (320 mg, 33%). (ES⁺) : m/z = 244 [M+H]⁺. TLC (Hexane/acétate d'éthyle: 4/1): R_f = 0,4. RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃): 1,63 - 1,78 (m, 2H), 1,89 - 2,09 (m, 3H), 2,29 (td, J = 7 Hz, 2,6 Hz, 2H), 3,45 (t, J = 7 Hz, 2H), 7,49 (t, J = 7,7 Hz, 1H), 7,63 (t, J = 7,7 Hz, 1H), 8,10 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 8,27 (d, J = 8,3 Hz, 1H).

(2R,3R)-thréoninol hydrochloré **45**

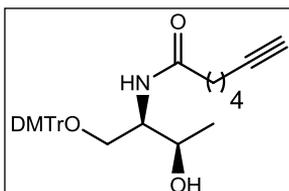


Mettre en suspension de la L-thréonine **44** (10 g, 84 mmol, 1 éq) dans de l'acétonitrile (150 mL) avec un mélange de hexaméthylidisilazane (54,2 mL, 260 mmol, 3 éq) et du chlorure de triméthylsilyle (2,16 mL, 17 mmol, 0,2 éq). Après 9h d'agitation à reflux, Filtrer et évaporer. Diluer l'huile jaune obtenue dans du dioxane (150 mL) sous atmosphère d'azote. Ajouter du BH₃·SMe₂ (41,4 mL, 436 mmol, 5 éq) et agiter le mélange pendant 10 h à reflux. Après retour à température ambiante, ajouter goutte à goutte du HCl 1M (80 mL) et chauffer à reflux le mélange pendant 1h. Evaporer le solvant et co-évaporer avec du méthanol contenant 1% d'HCl concentré (3 x 150 mL) pour obtenir le produit désiré sous forme d'une huile blanche (13,7 g, quant.). ESI-MS (ES⁺): m/z = 106 [M+H]⁺ (85%); m/z = 147 [M+H+CH₃CN]⁺ (100%). RMN ¹H (400MHz, D₂O) : 1,19 (d, J = 6,5 Hz, 3H), 2,69 (dt, J = 6,8 Hz, 5,1 Hz, 1H), 3,49 (dd, J = 11,3 Hz, 6,8 Hz, 1H), 3,65 (dd, J = 11,3 Hz, 5,1 Hz, 1H), 3,73 - 3,82 (m, 1H). RMN ¹³C (100MHz, D₂O) : 16,5, 54,8, 61,0, 65,8.

N-((2R,3R)-1,3-dihydroxy-2-butanyl)-6-heptynamide 28

Dissoudre le (2R,3R)-thréoninol hydrochloré **45** (4,42 g, 32 mmol, 1 éq) dans du méthanol sec (120 mL) avec de la triéthylamine (6,7 mL) et agiter la solution à température ambiante pendant 15 min.

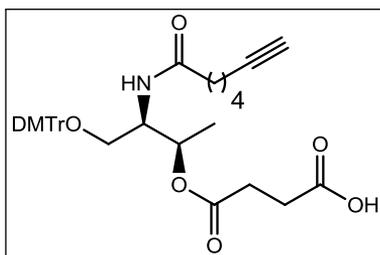
Ajouter l'acide activé 1-(6-heptynoyl)pyrrolidine-2,5-dione **38**, préalablement synthétisé, (3,5 g, 16 mmol, 0,5 éq) et agiter le mélange pendant 1h30. Evaporer le solvant et purifier le résidu sur colonne de silice (Eluant: CH₂Cl₂/ MeOH 9:1, v/v) pour obtenir le produit désiré **28** sous forme d'une huile blanche (1,70 g, 50%). TLC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v): R_f = 0,1. ESI-MS (ES⁺): m/z = 214 [M+H]⁺. RMN ¹H (400MHz, CDCl₃): 1,14 (d, J = 6,3 Hz, 3H), 1,52 (dt, J = 15,3 Hz, 7,0 Hz, 2H), 1,72 (dt, J = 15,3 Hz, 7,5 Hz, 2H), 1,94 (t, J = 2,5 Hz, 1H), 2,18 (td, J = 7,0 Hz, 2,5 Hz, 2H), 2,26 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 3,69 (d, J = 4,7 Hz, 2H), 3,78 (s, 1H), 4,08 - 4,15 (m, 1H), 6,62 (d, J = 8,4 Hz, 1H). RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) : 18,2, 20,3, 25,0, 28,0, 36,1, 55,1, 63,9, 67,6, 68,9, 84,2, 174,7.

N-(((2R,3R)-1-diméthoxytrityloxy)-3-hydroxy-2-butanyl)-6-heptynamide 46

Ajouter de la triéthylamine (1 mL, 12 mmol, 2 éq), du DMTrCl (2,55 g, 7,5 mmol, 1,25 éq) et du DMAP (22 mg, 0,18 mmol, 0,03 éq) à une solution de N-((2R,3R)-1,3-dihydroxy-2-butanyl)-6-heptynamide **28** (1,28 g, 6 mmol, 1 éq) dans de l'acétonitrile sec (10 mL). Agiter le mélange pendant 4h à température ambiante. Evaporer le solvant et purifier le résidu obtenu sur colonne de silice (Eluant: toluène/acétone/NEt₃ 88:7:5, v/v/v) pour obtenir le produit désiré **46** sous forme d'une huile incolore (250 mg, 8%). TLC (toluène/acétone/NEt₃ 88:7:5, v/v/v): R_f = 0,2. ESI-MS (ES⁺): m/z = 303 [DMTr]⁺ (100%), m/z = 538 [M+ Na]⁺ (25%). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): 1,17 (d, J = 6,4 Hz, 3H),

1,59 (m, 2H), 1,81 (m, 2H), 1,99 (s, 1H), 2,24 (m, 4H), 3,31 (dd, $J = 4$ Hz, 8 Hz, 1H), 3,4 (dd, $J = 4$ Hz, 8 Hz, 1H), 3,77 (s, 6H), 4,01 (m, 1H), 4,13 (m, 1H), 6,30 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 6,87 (d, $J = 8,9$ Hz, 4H), 7,15 - 7,46 (m, 9H). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 17,9, 19,8, 24,6, 27,6, 35,8, 53,4, 54,8, 64,6, 67,9, 68,6, 83,7, 86,4, 113,0, 125,0, 126,7, 127,7, 127,9, 135,4, 144,1, 158,1, 172,8.

Acide 4-((2R,3R)-4-(diméthoxytrityloxy)-3-(6-heptyn)amido-2-butanyloxy)-4-oxobutanoïque 47



Dans un ballon, ajouter le N-(((2R,3R)-1-diméthoxytrityloxy)-3-hydroxy-2-butanyl)-6-heptynamide **46** (110 mg, 0,2 mmol, 1 éq), de l'anhydride succinique (26 mg, 0,22 mmol, 1 éq) et du DMAP (1 mg, 0,01 mmol, 0,05 éq) à 10 mL de pyridine. Agiter le mélange à 55°C

pendant 4h. Ensuite, évaporer le solvant et purifier le résidu obtenu sur colonne de silice (Eluant : toluène/acétone/ NEt_3 76:19:5 v/v/v) pour obtenir le produit désiré **47** sous forme d'une huile blanche (80 mg, 61%). TLC (toluène/acétone/ NEt_3 76:19:5 v/v/v): $R_f = 0,4$; ESI-MS (ES^+): $m/z = 303$ [$\text{DMTr}]^+$ (40%), $m/z = 638$ [$\text{M}+\text{Na}]^+$ (15%), $m/z = 717$ [$\text{M}+\text{NEt}_3]^+$ (100%). RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD): 1,07 (d, $J = 5$ Hz, 3H), 1,52 - 1,57 (m, 2H), 1,70 - 1,79 (m, 2H), 2,17 (s, 1H), 2,15 - 2,20 (m, 2H), 2,26 - 2,32 (m, 2H), 3,07 - 3,32 (m, 6H), 3,77 (s, 6H), 3,97 - 3,99 (m, 2H), 6,85 (d, $J = 7,5$ Hz, 4H), 7,18 - 7,44 (m, 9H). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 17,2, 18,8, 26,2, 29,2, 36,4, 40,2, 47,6, 54,0, 55,8, 63,4, 69,9, 70,7, 84,7, 87,4, 108,1, 114,1, 127,9, 128,8, 131,3, 137,1, 146,3, 160,1, 173,8, 176,0, 178,3.

5.3.2 Synthèse du siRNA

5.3.2.1 Brin sens et antisens

L'acide 4-((3S,5R)-5-((diméthoxytrityloxy)méthyl)-1-(6-heptynoyl)-3-pyrrolidinyloxy)-4-oxobutanoïque **43** a été lié à un support solide de type CPG (controlled pore glass) modifié par une fonction amine chez Eurogentec (Seraing, Belgique). La CPG a préalablement été rincée avec une solution de diisopropylamine 1% dans du dichlorométhane. Elle (1 éq) a ensuite été ajoutée avec du HBTU (5 éq) à une solution de linker **43** (5 éq) dans une solution de diisopropylamine 1% dans du dichlorométhane et le tout a été agité pendant une nuit à température ambiante. La CPG a ensuite été rincée successivement par une solution de diisopropylamine 1% dans du dichlorométhane, du méthanol, de l'éther diéthylique et du dichlorométhane, et finalement séchée sous vide. La CPG a ensuite été plongée dans un mélange 1/1 de deux solutions (Solution 1: 10% Ac₂O dans THF; solution 2: N-méthylimidazole/pyridine/THF 1/1/8) et finalement rincée et séchée comme décrit précédemment pour obtenir le composé **48**. Le groupe DMTr d'une aliquote de résine a été enlevé avec un mélange HCl/MeOH 3/2 (25 mL) et l'absorbance a été analysée à 495 nm pour déterminer la charge de la résine. Celle-ci est de 33 µmol/g. Le brin sens et le brin antisens ont été synthétisés (en utilisant la chimie des phosphoramidites avec de l'ARN naturel 0,1 M dans de l'acétonitrile avec du benzylmercaptotétrazole comme agent activant) au départ du support solide modifié avec notre composé **43** et d'un support solide standard respectivement. La séquence oligonucléotidique utilisée et précédemment étudiée par Garbaki et son équipe (138) est la suivante : UCACUUACAGGAUCUAUAA-3 (brin sens) et 5-UUAUAGAUCUGUAAGUGA-3 (brin antisens). L'oligonucléotide **49** a

été décroché de la CPG dans un mélange 1/1 méthylamine/NH₄OH 28% et il a ensuite été purifié sur une colonne NAP10 Sephadex G-25 de chez GE Healthcare.

5.3.2.2 Synthèse du siRNA double brin

Les conditions de réaction pour la formation du siRNA double brin sont les suivantes. Le brin sens a été dissous dans de l'eau et mélangé avec une quantité stoechiométrique du brin antisens (dissous dans l'eau RNase free). L'annealing s'est déroulé dans une solution de tampon Tris (50 mM) et une solution aqueuse de NaCl (100 mM, pH 7,5-8). Le mélange réactionnel a été chauffé à 90°C pendant 15 min puis à 37°C pendant 15 min et ensuite agité à température ambiante pendant 1h. Le siRNA double brin **50** a ensuite été lyophilisé.

5.3.3 Chimie Click : synthèse du [¹⁹F]siRNA

Le synthon 1-(azidométhyl)-4-[¹⁹F]fluorobenzène **26** a été synthétisé comme décrit par Demko et Sharpless. (139) Le synthon **26** (66 µL d'une solution stock 40,8 mM dans un mélange DMSO/t-BuOH: 3/1, v/v), du complexe CuSO₄.5H₂O/TBTA 1/1 (21,6 µL d'une solution stock 0,05 M dans un mélange H₂O/DMSO/t-BuOH: 13,5/3,5/3, v/v/v) et de l'ascorbate de sodium (10,8 µL d'une solution stock 0,8 M dans de l'eau) ont été ajoutés au siRNA double brin **50** (54 nmol dans 18 µL d'eau). Le mélange est agité pendant 2h à température ambiante. Le produit obtenu **51** est purifié par HPLC analytique et finalement lyophilisé. HPLC analytique : t_R = 14,48 min. Spectroscopie ESI-Q-ToF: 13692,001 (double brin), 7037,000 (brin sens), 6656,001 (brin antisens).

5.3.4 Radiochimie

Le synthon 1-(azidométhyl)-4-[¹⁸F]fluorobenzène [**¹⁸F**]26 a été synthétisé comme décrit par Thonon et son équipe. (73) Le siRNA double brin **50** (20 nmol) dans de l'eau (12 µL), de l'ascorbate de sodium (4 µL, 0,8M) dans de l'eau, du complexe CuSO₄·5H₂O/TBTA 1/1 (8 µL, 0,05 M) dans un mélange DMSO/H₂O 1/3 (v/v) ont été ajoutés à une solution de 1-(azidométhyl)-4-[¹⁸F]fluorobenzène [**¹⁸F**]26 (200 mBq) dans du DMSO (0,5 mL). Le mélange a été agité à température ambiante pendant 15 min. Après dilution avec 4 mL d'éluant HPLC, le produit brut a été purifié par HPLC semipréparative (colonne utilisée : Jupiter Proteo 90Å). La fraction contenant le [¹⁸F]siRNA [**¹⁸F**]51 pur (rt = 20,2 min) a été récoltée et diluée dans de l'eau (50 mL), trappée sur une cartouche tC18 plus Sep Pak. Celle-ci a été éluée avec de l'éthanol (1mL) et le composé [**¹⁸F**]51 a finalement été transféré sur une colonne NAP10® (GE Healthcare) Sephadex G-25. Cette cartouche a été éluée avec une solution physiologique pour obtenir le [¹⁸F]siRNA [**¹⁸F**]51 dans 10 mL d'une solution injectable.

6 Références

- (1) Herzog, H. (2001) *In Vivo Functional Imaging with SPECT and PET*. *Radiochimica Acta* 89, 203-214.
- (2) Ametamey, S. M., Honer, M., and Schubiger, P. A. (2008) *Molecular Imaging with PET*. *Chemical Reviews* 108, 1501-1516.
- (3) Phelps, M. E. (2000) *Positron Emission Tomography Provides Molecular Imaging of Biological Processes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 97, 9226-9233.
- (4) Lubberink, M., Tolmachev, V., Widström, C., Bruskin, A., Lundqvist, H., and Westlin, J.-E. (2002) *¹¹⁰In-DTPA-d-Phe1-Octreotide for Imaging of Neuroendocrine Tumors with PET*. *Journal of Nuclear Medicine* 43, 1391-1397.
- (5) Lundqvist, H., and Tolmachev, V. (2002) *Targeting Peptides and Positron Emission Tomography*. *Peptide Science* 66, 381-392.
- (6) Pauwels, E. K. J., Ribeiro, M. J., Stoot, J. H. M. B., McCready, V. R., Bourguignon, M., and Mazière, B. (1998) *FDG Accumulation and Tumor Biology*. *Nuclear Medicine and Biology* 25, 317-322.
- (7) Serdons, K., Verbruggen, A., and Bormans, G. M. (2009) *Developing New Molecular Imaging Probes for PET*. *Methods* 48, 104-111.
- (8) Anderson, C. J., and Welch, M. J. (1999) *Radiometal-Labeled Agents (Non-Technetium) for Diagnostic Imaging*. *Chemical Reviews* 99, 2219-2234.
- (9) Fichna, J., and Janecka, A. (2002) *Synthesis of Target-Specific Radiolabeled Peptides for Diagnostic Imaging*. *Bioconjugate Chemistry* 14, 3-17.
- (10) Zhang, Y., Hong, H., and Ca, W. (2011) *PET Tracers Based on Zirconium-89*. *Current Radiopharmaceuticals* 4, 131-139.
- (11) Michel, R. B., Rosario, A. V., Andrews, P. M., Goldenberg, D. M., and Mattes, M. J. (2005) *Therapy of Small Subcutaneous B-Lymphoma Xenografts with Antibodies Conjugated to Radionuclides Emitting Low-Energy Electrons*. *Clinical Cancer Research* 11, 777-786.
- (12) Liu, S., and Edwards, D. S. (1999) *^{99m}Tc-Labeled Small Peptides as Diagnostic Radiopharmaceuticals*. *Chemical Reviews* 99, 2235-2268.
- (13) Baidoo, K. E., Scheffel, U., Stathis, M., Finley, P., Lever, S. Z., Zhan, Y., and Wagner, H. N. (1998) *High-Affinity No-Carrier-Added ^{99m}Tc-Labeled Chemotactic Peptides for Studies of Inflammation in Vivo*. *Bioconjugate Chemistry* 9, 208-217.
- (14) Lister-James, J., Vallabhajosula, S., Moyer, B. R., Pearson, D. A., McBride, B. J., De Rosch, M. A., Bush, L. R., Machac, J., and

- Dean, R. T. (1997) *Pre-Clinical Evaluation of Technetium-99m Platelet Receptor-Binding Peptide*. *Journal of Nuclear Medicine* 38, 105-111.
- (15) Fischman, A. J., Babich, J. W., and Strauss, H. W. (1993) *A Ticket to Ride: Peptide Radiopharmaceuticals*. *Journal of Nuclear Medicine* 34, 2253-2263.
- (16) Benjamin, P. P., Rejali, A., and Friedell, H. (1970) *Electrolytic Complexation of 99mTc at Constant Current: Its Applications in Nuclear Medicine*. *Journal of Nuclear Medicine* 11, 147-154.
- (17) Blok, D., Feitsma, R. I. J., Vermeij, P., and Pauwels, E. J. K. (1999) *Peptide Radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine*. *European Journal of Nuclear Medicine* 26, 1511-1519.
- (18) Wagner, S. J., and Welch, M. J. (1979) *Gallium-68 Labeling of Albumin and Albumin Microspheres*. *Journal of Nuclear Medicine* 20, 428-433.
- (19) Masuda, R., Oishi, S., Ohno, H., Kimura, H., Saji, H., and Fujii, N. (2011) *Concise Site-Specific Synthesis of DTPA–Peptide Conjugates: Application to Imaging Probes for the Chemokine Receptor CXCR4*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19, 3216-3220.
- (20) Jones-Wilson, T. M., Deal, K. A., Anderson, C. J., McCarthy, D. W., Kovacs, Z., Motekaitis, R. J., Sherry, A. D., Martell, A. E., and Welch, M. J. (1998) *The In Vivo Behavior of Copper-64-Labeled Azamacrocyclic Complexes*. *Nuclear Medicine and Biology* 25, 523-530.
- (21) de Jong, M., Bakker, W. H., Krenning, E. P., Breeman, W. A. P., van der Pluijm, M. E., Bernard, B. F., Visser, T. J., Jermann, E., Béhé, M., Powell, P., and Mäcke, H. R. (1997) *Yttrium-90 and Indium-111 Labelling, Receptor Binding and Biodistribution of [DOTA ,d-Phe ,Tyr]Octreotide, a Promising Somatostatin Analogue for Radionuclide Therapy*. *European Journal of Nuclear Medicine* 24, 368-371.
- (22) Hofmann, M., Maecke, H., Börner, R., Weckesser, E., Schöffski, P., Oei, L., Schumacher, J., Henze, M., Heppeler, A., Meyer, J., and Knapp, H. (2001) *Biokinetics and Imaging with the Somatostatin Receptor PET Radioligand 68Ga-DOTATOC: Preliminary Data*. *European Journal of Nuclear Medicine* 28, 1751-1757.
- (23) Stasiuk, G. J., and Long, N. J. (2013) *The Ubiquitous DOTA and its Derivatives: the Impact of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-Tetraacetic Acid on Biomedical Imaging*. *Chemical Communications* 49, 2732-2746.

- (24) Breeman, W. P., Jong, M., Blois, E., Bernard, B., Konijnenberg, M., and Krenning, E. (2005) Radiolabelling DOTA-Peptides with ^{68}Ga . *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32, 478-485.
- (25) Breeman, W. P., Jong, M., Visser, T., Erion, J., and Krenning, E. (2003) Optimising Conditions for Radiolabelling of DOTA-Peptides with ^{90}Y , ^{111}In and ^{177}Lu at High Specific Activities. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30, 917-920.
- (26) Ebenhan, T., Chadwick, N., Sathekge, M. M., Govender, P., Govender, T., Kruger, H. G., Marjanovic-Painter, B., and Zeevaart, J. R. (2014) Peptide Synthesis, Characterization and ^{68}Ga -Radiolabeling of NOTA-Conjugated Ubiquitin Fragments for Prospective Infection Imaging with PET/CT. *Nuclear Medicine and Biology* 41, 390-400.
- (27) Asti, M., Iori, M., Capponi, P. C., Atti, G., Rubagotti, S., Martin, R., Brenner, A., Müller, M., Bergmann, R., Erba, P. A., and Versari, A. (2014) Influence of Different Chelators on the Radiochemical Properties of a ^{68}Ga -Labelled Bombesin Analogue. *Nuclear Medicine and Biology* 41, 24-35.
- (28) Notni, J., Pohle, K., and Wester, H.-J. (2012) Comparative Gallium-68 Labeling of TRAP-, NOTA-, and DOTA-Peptides: Practical Consequences for the Future of Gallium-68-PET. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging Research* 2.
- (29) de Sá, A., Matias, Á. A., Prata, M. I. M., Geraldés, C. F. G. C., Ferreira, P. M. T., and André, J. P. (2010) Gallium Labeled NOTA-Based Conjugates for Peptide Receptor-Mediated Medical Imaging. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20, 7345-7348.
- (30) Weiner, R. E., and Thakur, M. L. (2001) Radiolabeled Peptides in Diagnosis and Therapy. *Seminars in Nuclear Medicine* 31, 296-311.
- (31) Anderson, C. J., Connett, J. M., Schwarz, S. W., Rocque, P. A., Guo, L. W., Philpott, G. W., Zinn, K. R., Meares, C. F., and Welch, M. J. (1992) Copper-64-Labeled Antibodies for PET Imaging. *Journal of Nuclear Medicine* 33, 1685-1691.
- (32) Miller, P. W., Long, N. J., Vilar, R., and Gee, A. D. (2008) Synthesis of ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O , and ^{13}N Radiolabels for Positron Emission Tomography. *Angewandte Chemie International Edition* 47, 8998-9033.
- (33) Straatman, M. G., and Welch, M. J. (1975) A General Method for Labeling Proteins with ^{11}C . *Journal of Nuclear Medicine* 16, 425-428.

- (34) Yngve, U., Khan, T. S., Bergström, M., and Långström, B. (2001) Labelling of Octreotide Using ^{76}Br -Prosthetic Groups. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 44, 561-573.
- (35) McElvany, K. D., and Welch, M. J. (1980) Characterization of Bromine-77-Labeled Proteins Prepared Using Bromoperoxidase. *Journal of Nuclear Medicine* 21, 953-960.
- (36) Wilbur, D. S. (1992) Radiohalogenation of Proteins: An Overview of Radionuclides, Labeling Methods and Reagents for Conjugate Labeling. *Bioconjugate Chemistry* 3, 433-470.
- (37) Djang, D. S. W., Janssen, M. J. R., Bohnen, N., Booij, J., Henderson, T. A., Herholz, K., Minoshima, S., Rowe, C. C., Sabri, O., Seibyl, J., Van Berckel, B. N. M., and Wanner, M. (2012) SNM Practice Guideline for Dopamine Transporter Imaging with ^{123}I -Ioflupane SPECT 1.0. *Journal of Nuclear Medicine* 53, 154-163.
- (38) Pagani, M., Stone-Elander, S., and Larsson, S. A. (1997) Alternative Positron Emission Tomography with Non-Conventional Positron Emitters: Effects of Their Physical Properties on Image Quality and Potential Clinical Applications. *European Journal of Nuclear Medicine* 24, 1301-1327.
- (39) Wilbur, D. S., Hadley, S. W., Hylarides, M. D., Abrams, P. G., Beaumier, P. A., Morgan, A. C., Reno, J. M., and Fritzberg, A. R. (1989) Development of a Stable Radioiodinating Reagent to Label Monoclonal Antibodies for Radiotherapy of Cancer. *Journal of Nuclear Medicine* 30, 216-226.
- (40) Firnau, G., Chirakal, R., and Garnett, E. S. (1984) Aromatic Radiofluorination with ^{18}F Fluorine Gas: 6- ^{18}F Fluoro-L-Dopa. *Journal of Nuclear Medicine* 25, 1228-1233.
- (41) Chirakal, R., Firnau, G., and Garnett, E. S. (1986) High Yield Synthesis of 6- ^{18}F Fluoro-L-Dopa. *Journal of Nuclear Medicine* 27, 417-421.
- (42) Hess, E., Sichler, S., Kluge, A., and Coenen, H. H. (2002) Synthesis of 2- ^{18}F Fluoro-L-Tyrosine via Regiospecific Fluoro-Destannylation. *Applied Radiation and Isotopes* 57, 185-191.
- (43) Dolle, F., Dempfel, S., Hinnen, F., Fournier, D., Vaufrey, F., and Crouzel, C. (1998) 6- ^{18}F Fluoro-L-DOPA by Radiofluorodestannylation: a Short and Simple Synthesis of a New Labelling Precursor. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 41, 105-114.
- (44) Luxen, A., Perlmutter, M., Bida, G., Van Moffart, G., Cook, J., Satyamurthy, N., Phelps, M., and Barrio, J. (1990) Remote, Semi-Automated Production of 6- ^{18}F Fluoro-L-dopa for Human Studies with PET. *Applied Radiation and Isotopes* 41, 275-281.

- (45) Coenen, H. H., Kling, P., and Stöcklin, G. (1989) Cerebral Metabolism of L-2-[18F]Fluorotyrosine, a New PET Tracer of Protein Synthesis. *Journal of Nuclear Medicine* 30, 1367-1372.
- (46) Cai, L., Lu, S., and Pike, V. W. (2008) Chemistry with [18F]Fluoride Ion. *European Journal of Organic Chemistry* 2008, 2853-2873.
- (47) Tredwell, M., and Gouverneur, V. (2012) 18F Labeling of Arenes. *Angewandte Chemie International Edition* 51, 11426-11437.
- (48) Le Bars, D. (2005) Tomographie par Emission de Positons: les Possibilités de Marquage au Fluor-18. *Médecine Nucléaire - Imagerie Fonctionnelle et Métabolique* 29, 190-194.
- (49) Okarvi, S. M. (2001) Recent Progress in Fluorine-18 Labelled Peptide Radiopharmaceuticals. *European Journal of Nuclear Medicine* 28, 929-938.
- (50) Sivolapenko, G. B., Douli, V., Sirmalis, G., Merkouri, E., Konstantinides, K., Pectasides, D., Skarlos, D., Courtenay-Luck, N. S., Epenetos, A. A., Hussain, R., Cook, J., and Courtenay-Luck, N. S. (1995) Breast Cancer Imaging with Radiolabelled Peptide from Complementarity-Determining Region of Antitumour Antibody. *The Lancet* 346, 1662-1666.
- (51) Varagnolo, L., Stokkel, M. P. M., Mazzi, U., and Pauwels, E. K. J. (2000) 18F-Labeled Radiopharmaceuticals for PET in Oncology, Excluding FDG. *Nuclear Medicine and Biology* 27, 103-112.
- (52) Jacobson, O., Zhu, L., Ma, Y., Weiss, I. D., Sun, X., Niu, G., Kiesewetter, D. O., and Chen, X. (2011) Rapid and Simple One-Step F-18 Labeling of Peptides. *Bioconjugate Chemistry* 22, 422-428.
- (53) Becaud, J., Mu, L., Karamkam, M., Schubiger, P. A., Ametamey, S. M., Graham, K., Stellfeld, T., Lehmann, L., Borkowski, S., Berndorff, D., Dinkelborg, L., Srinivasan, A., Smits, R., and Kokschi, B. (2009) Direct One-Step 18F-Labeling of Peptides via Nucleophilic Aromatic Substitution. *Bioconjugate Chemistry* 20, 2254-2261.
- (54) Roehn, U., Becaud, J., Mu, L., Srinivasan, A., Stellfeld, T., Fitzner, A., Graham, K., Dinkelborg, L., Schubiger, P. A., and Ametamey, S. M. (2009) Nucleophilic Ring-Opening of Activated Aziridines: A One-Step Method for Labeling Biomolecules with Fluorine-18. *Journal of Fluorine Chemistry* 130, 902-912.
- (55) Kilbourn, M. R., Dence, C. S., Welch, M. J., and Mathias, C. J. (1987) Fluorine-18 Labeling of Proteins. *Journal of Nuclear Medicine* 28, 462-470.
- (56) Wester, H.-J., Hamacher, K., and Stöcklin, G. (1996) A Comparative Study of N.C.A. Fluorine-18 Labeling of Proteins via

- Acylation and Photochemical Conjugation. Nuclear Medicine and Biology* 23, 365-372.
- (57) Vaidyanathan, G., and Zalutsky, M. R. (2006) Synthesis of N-Succinimidyl 4-[18F]Fluorobenzoate, an Agent for Labeling Proteins and Peptides with 18F. *Nature Protocols* 1, 1655-1661.
- (58) Cai, W., Zhang, X., Wu, Y., and Chen, X. (2006) A Thiol-Reactive 18F-Labeling Agent, N-[2-(4-18F-Fluorobenzamido)Ethyl]Maleimide, and Synthesis of RGD Peptide-Based Tracer for PET Imaging of $\alpha v \beta 3$ Integrin Expression. *Journal of Nuclear Medicine* 47, 1172-1180.
- (59) Lemaire, C., Guillaume, M., Christiaens, L., Palmer, A. J., and Cantineau, R. (1987) A New Route for the Synthesis of [18F]Fluoroaromatic Substituted Amino Acids: No Carrier Added L-p-[18F]Fluorophenylalanine. *Applied Radiation and Isotopes* 38, 1033-1038.
- (60) Zhang, X., Cai, W., Cao, F., Schreibmann, E., Wu, Y., Wu, J. C., Xing, L., and Chen, X. (2006) 18F-Labeled Bombesin Analogs for Targeting GRP Receptor-Expressing Prostate Cancer. *Journal of Nuclear Medicine* 47, 492-501.
- (61) Li, X.-G., Haaparanta, M., and Solin, O. (2012) Oxime Formation for Fluorine-18 Labeling of Peptides and Proteins for Positron Emission Tomography (PET) Imaging: A Review. *Journal of Fluorine Chemistry* 143, 49-56.
- (62) Mäding, P., Füchtner, F., Johannsen, B., Steinbach, J., Hilger, C. S., Friebe, M., Halks-Miller, M., Horuk, R., and Mohan, R. (2006) 18F-Labeling of a Potent Nonpeptide CCR1 Antagonist: Synthesis of 1-(5-chloro-2-{2-[(2R)-4-(4-[18F]Fluorobenzyl)-2-Methylpiperazin-1-yl]-2-Oxoethoxy}Phenyl)Urea in an Automated Module. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 49, 253-262.
- (63) Apana, S. M., Griffin, R. J., Koonce, N. A., Webber, J. S., Dings, R. P. M., Mayo, K. H., and Berridge, M. S. (2011) Synthesis of [18F]Anginex with High Specific Activity [18F]Fluorobenzaldehyde for Targeting Angiogenic Activity in Solid Tumors. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 54, 708-713.
- (64) Hohne, A., Yu, L., Mu, L., Reiher, M., Voigtmann, U., Klar, U., Graham, K., Schubiger, P. A., and Ametamey, S. M. (2009) Organofluorosilanes as Model Compounds for 18F-Labeled Silicon-Based PET Tracers and Their Hydrolytic Stability: Experimental Data and Theoretical Calculations (PET = Positron Emission Tomography). *Chemistry: An European Journal* 15, 3736-43.
- (65) Balentova, E., Collet, C., Lamandé-Langle, S., Chrétien, F., Thonon, D., Aerts, J., Lemaire, C., Luxen, A., and Chapleur, Y.

- (2011) *Synthesis and Hydrolytic Stability of Novel 3-[18F]Fluoroethoxybis(1-Methylethyl)Silyl]Propanamine-Based Prosthetic Groups. Journal of Fluorine Chemistry* 132, 250-257.
- (66) Schulz, J., Vimont, D., Bordenave, T., James, D., Escudier, J.-M., Allard, M., Szlosek-Pinaud, M., and Fouquet, E. (2011) *Silicon-Based Chemistry: An Original and Efficient One-Step Approach to [18F]-Nucleosides and [18F]-Oligonucleotides for PET Imaging. Chemistry: An European Journal* 17, 3096-3100.
- (67) Mu, L., Höhne, A., Schubiger, P. A., Ametamey, S. M., Graham, K., Cyr, J. E., Dinkelborg, L., Stellfeld, T., Srinivasan, A., Voigtmann, U., and Klar, U. (2008) *Silicon-Based Building Blocks for One-Step 18F-Radiolabeling of Peptides for PET Imaging. Angewandte Chemie International Edition* 47, 4922-4925.
- (68) Höhne, A., Mu, L., Honer, M., Schubiger, P. A., Ametamey, S. M., Graham, K., Stellfeld, T., Borkowski, S., Berndorff, D., Klar, U., Voigtmann, U., Cyr, J. E., Friebe, M., Dinkelborg, L., and Srinivasan, A. (2008) *Synthesis, 18F-Labeling, and In Vitro and In Vivo Studies of Bombesin Peptides Modified with Silicon-Based Building Blocks. Bioconjugate Chemistry* 19, 1871-1879.
- (69) Olberg, D. E., Hjelstuen, O. K., Solbakken, M., Arukwe, J., Karlsen, H., and Cuthbertson, A. (2008) *A Novel Prosthetic Group for Site-Selective Labeling of Peptides for Positron Emission Tomography. Bioconjugate Chemistry* 19, 1301-8.
- (70) Sletten, E. M., and Bertozzi, C. R. (2009) *Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality. Angewandte Chemie International Edition* 48, 6974-6998.
- (71) Thonon, D., Goukens, E., Kaisin, G., Paris, J., Flagothier, J., and Luxen, A. (2011) *Photoactivated 1,3-Dipolar Cycloaddition for the Rapid Preparation of 18F Labelled Radiotracers. Tetrahedron* 67, 5572-5576.
- (72) Keliher, E. J., Reiner, T., Thurber, G. M., Upadhyay, R., and Weissleder, R. (2012) *Efficient 18F-Labeling of Synthetic Exendin-4 Analogues for Imaging Beta Cells. ChemistryOpen* 1, 177-183.
- (73) Thonon, D., Kech, C., Paris, J., Lemaire, C., and Luxen, A. (2009) *New Strategy for the Preparation of Clickable Peptides and Labeling with 1-(Azidomethyl)-4-[18F]Fluorobenzene for PET. Bioconjugate Chemistry* 20, 817-23.
- (74) Walker, W. H., and Rokita, S. E. (2003) *Use of a Boroxazolidone Complex of 3-Iodo-L-tyrosine for Palladium-Catalyzed Cross-Coupling. The Journal of Organic Chemistry* 68, 1563-1566.
- (75) Kurreck, J. (2009) *RNA Interference: From Basic Research to Therapeutic Applications. Angewandte Chemie International Edition* 48, 1378-98.

- (76) de Fougérolles, A., Vornlocher, H. P., Maraganore, J., and Lieberman, J. (2007) *Interfering with Disease: a Progress Report on siRNA-Based Therapeutics*. *Nature Reviews Drug Discovery* 6, 443-453.
- (77) Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998) *Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in Caenorhabditis Elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- (78) Tavitian, B. (2003) *In Vivo Imaging with Oligonucleotides for Diagnosis and Drug Development*. *Gut* 52, iv40-iv47.
- (79) Bumcrot, D., Manoharan, M., Koteliensky, V., and Sah, D. W. (2006) *RNAi Therapeutics: a Potential New Class of Pharmaceutical Drugs*. *Nature Chemical Biology* 2, 711-719.
- (80) Jinek, M., and Doudna, J. A. (2009) *A Three-Dimensional View of the Molecular Machinery of RNA Interference*. *Nature* 457, 405-412.
- (81) Siomi, H., and Siomi, M. C. (2009) *On the Road to Reading the RNA-Interference Code*. *Nature* 457, 396-404.
- (82) Wilson, C., and Keefe, A. D. (2006) *Building Oligonucleotide Therapeutics Using Non-Natural Chemistries*. *Current Opinion in Chemical Biology* 10, 607-614.
- (83) Kuhnast, B., Dolle, F., Vaufrey, F., Hinnen, F., Crouzel, C., and Tavitian, B. (2000) *Fluorine-18 Labeling of Oligonucleotides Bearing Chemically - Modified Ribose - Phosphate Backbones*. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 43, 837-848.
- (84) Hedberg, E., and Langstrom, B. (1998) *18F-Labeling of Oligonucleotides Using Succinimido 4-[18F]Fluorobenzoate*. *Acta Chemica Scandinavica* 52, 1034-1039.
- (85) Hedberg, E., and Langstrom, B. (1997) *Synthesis of 4-([18F]Fluoromethyl)phenyl Isothiocyanate and its Use in Labelling Oligonucleotides*. *Acta Chemica Scandinavica* 51, 1236-1240.
- (86) Lange, C. W., VanBrocklin, H. F., and Taylor, S. E. (2002) *Photoconjugation of 3-Azido-5-Nitrobenzyl-[18F]Fluoride to an Oligonucleotide Aptamer*. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 45, 257-268.
- (87) Dollé, F., Hinnen, F., Vaufrey, F., Tavitian, B., and Crouzel, C. (1997) *A General Method for Labeling Oligodeoxynucleotides with 18F for In Vivo PET Imaging*. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 39, 319-330.
- (88) Kuhnast, B., Klusmann, S., Hinnen, F., Boisgard, R., Rousseau, B., Fürste, J. P., Tavitian, B., and Dollé, F. (2003) *Fluorine-18- and Iodine-125-Labeling of Spiegelmers*. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 46, 1205-1219.

- (89) Koslowsky, I., Shahhosseini, S., Wilson, J., and Mercer, J. (2008) Automated Radiosynthesis of N-(4-[18F]Fluorobenzyl)-2-Bromoacetamide: an F-18-Labeled Reagent for the Prosthetic Radiolabeling of Oligonucleotides. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 51, 352-356.
- (90) Kuhnast, B., de Bruin, B., Hinnen, F., Tavitian, B., and Dolle, F. (2004) Design and Synthesis of a New [18F]Fluoropyridine-Based Haloacetamide Reagent for the Labeling of Oligonucleotides: 2-Bromo-N-[3-(2-[18F]Fluoropyridin-3-yloxy)Propyl]Acetamide. *Bioconjugate Chemistry* 15, 617-627.
- (91) Von Guggenberg, E., Sader, J. A., Wilson, J. S., Shahhosseini, S., Koslowsky, I., Wuest, F., and Mercer, J. R. (2009) Automated Synthesis of an 18F-Labelled Pyridine-Based Alkylating Agent for High Yield Oligonucleotide Conjugation. *Applied Radiation and Isotopes* 67, 1670-1675.
- (92) Temsamani, J., Tang, J.-Y., Padmapriya, A., Kubert, M., and Agrawal, S. (1993) Pharmacokinetics, Biodistribution, and Stability of Capped Oligodeoxynucleotide Phosphorothioates in Mice. *Antisense Research and Development* 3, 277-284.
- (93) Stetsenko, D. A., and Gait, M. J. (2001) A Convenient Solid-Phase Method for Synthesis of 3'-Conjugates of Oligonucleotides. *Bioconjugate Chemistry* 12, 576-586.
- (94) Viel, T., Kuhnast, B., Hinnen, F., Boisgard, R., Tavitian, B., and Dolle, F. (2007) Fluorine-18 Labelling of Small Interfering RNAs (SiRNAs) for PET Imaging. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 50, 1159-1168.
- (95) Viel, T., Boisgard, R., Kuhnast, B., Jego, B., Siquier-Pernet, K., Hinnen, F., Dolle, F., and Tavitian, B. (2008) Molecular Imaging Study on In Vivo Distribution and Pharmacokinetics of Modified Small Interfering RNAs (SiRNAs). *Oligonucleotides* 18, 201-212.
- (96) Mercier, F., Paris, J., Kaisin, G., Thonon, D., Flagothier, J., Teller, N., Lemaire, C., and Luxen, A. (2011) A General Method for Labeling SiRNA by Click Chemistry with 18F for In Vivo PET Imaging. *Bioconjugate Chemistry* 22, 108-114.
- (97) Ustinov, A. V., Dubnyakova, V. V., and Korshun, V. A. (2008) A Convenient "Click Chemistry" Approach to Perylene Diimide-Oligonucleotide Conjugates. *Tetrahedron* 64, 1467-1473.
- (98) Amblard, F., Cho, J. H., and Schinazi, R. F. (2009) Cu(I)-Catalyzed Huisgen Azide-Alkyne 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction in Nucleoside, Nucleotide, and Oligonucleotide Chemistry. *Chemical Reviews* 109, 4207-4220.
- (99) Meldal, M., and Tornøe, C. W. (2008) Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. *Chemical Reviews* 108, 2952-3015.

- (100) Yamada, T., Peng, C. G., Matsuda, S., Addepalli, H., Jayaprakash, K. N., Alam, M. R., Mills, K., Maier, M. A., Charisse, K., Sekine, M., Manoharan, M., and Rajeev, K. G. (2011) Versatile Site-Specific Conjugation of Small Molecules to siRNA Using Click Chemistry. *The Journal of Organic Chemistry* 76, 1198-1211.
- (101) El-Sagheer, A. H., and Brown, T. (2009) Synthesis and Polymerase Chain Reaction Amplification of DNA Strands Containing an Unnatural Triazole Linkage. *Journal of the American Chemical Society* 131, 3958-3964.
- (102) Sirion, U., Kim, H. J., Lee, J. H., Seo, J. W., Lee, B. S., Lee, S. J., Oh, S. J., and Chi, D. Y. (2007) An Efficient F-18 Labeling Method for PET Study: Huisgen 1,3-Dipolar Cycloaddition of Bioactive Substances and F-18-Labeled Compounds. *Tetrahedron Letters* 48, 3953-3957.
- (103) Mamat, C., Ramenda, T., and Wuest, F. R. (2009) Recent Applications of Click Chemistry for the Synthesis of Radiotracers for Molecular Imaging. *Mini-Reviews in Organic Chemistry* 6, 21-34.
- (104) Wängler, C., Schäfer, M., Schirmacher, R., Bartenstein, P., and Wängler, B. (2011) DOTA Derivatives for Site-Specific Biomolecule-Modification via Click Chemistry: Synthesis and Comparison of Reaction Characteristics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19, 3864-3874.
- (105) Shiraishi, T., Kitamura, Y., Ueno, Y., and Kitade, Y. (2011) Synthesis of Oligonucleotides Possessing Versatile Probes for PET Labelling and Their Rapid Ligand-Free Click Reaction. *Chemical Communications* 47, 2691-2693.
- (106) Ban, H., Gavrilyuk, J., and Barbas, C. F. (2010) Tyrosine Bioconjugation through Aqueous Ene-Type Reactions: A Click-Like Reaction for Tyrosine. *Journal of the American Chemical Society* 132, 1523-1525.
- (107) Ban, H., Nagano, M., Gavrilyuk, J., Hakamata, W., Inokuma, T., and Barbas, C. F. (2013) Facile and Stable Linkages through Tyrosine: Bioconjugation Strategies with the Tyrosine-Click Reaction. *Bioconjugate Chemistry* 24, 520-532.
- (108) Alakurtti, S., Heiska, T., Kiriazis, A., Sacerdoti-Sierra, N., Jaffe, C. L., and Yli-Kauhaluoma, J. (2010) Synthesis and Anti-Leishmanial Activity of Heterocyclic Betulin Derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18, 1573-1582.
- (109) Mallakpour, S., and Zandi, H. (2006) Step-Growth Polymerization of 4-(1-Naphthyl)-1,2,4-triazolidine-3,5-dione with Diisocyanates. *Polymer Bulletin* 57, 611-621.

- (110) Mallakpour, S., and Rafiee, Z. (2007) Novel and Efficient Synthesis of 4-Substituted-1,2,4-triazolidine-3,5-diones from Anilines. *Synthetic Communications* 37, 1927-1934.
- (111) Cookson, R. C., Gupte, S. S., Stevens, I. D. R., and Watts, C. T. (1971) 4-Phenyl-1,2,4-Triazoline-3,5-Dione. *Organic Syntheses* 51, 121-127.
- (112) Zolfigol, M. A., Mallakpour, S., Khazaiaie, A., Vaghaie, R. G., and Torabi, M. (2004) Calcium Hypochlorite as an Efficient Reagent for Oxidation of Urazoles under Mild Heterogeneous Conditions. *Russian Journal of Organic Chemistry* 40, 914-916.
- (113) Zolfigol, M. A., Bagherzadeh, M., Mallakpour, S., Chehardoli, G., Ghorbani-Choghamarani, A., Koukabi, N., Dehghanian, M., and Doroudgar, M. (2007) The First Report on the Catalytic Oxidation of Urazoles to Their Corresponding Triazolinediones via In Situ Catalytic Generation of Br⁺ Using Periodic Acid or Oxone®/KBr System. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 270, 219-224.
- (114) Ghorbani-Choghamarani, A., Zeinivand, J., and Mallakpour, S. (2010) Catalytic and Efficient Oxidation of Urazole Derivatives to Their Corresponding Triazolinediones Using Ammonium Nitrate and Metal Hydrogen Sulfate as Catalyst. *Chinese Journal of Chemistry* 28, 1189-1192.
- (115) Silverstein, R. M., Basler, G. C., and Morill, T. C. (1998) *Identification spectrométrique de composés organiques*, DeBoeck Université ed.
- (116) Aerts, J., Voccia, S., Lemaire, C., Giacomelli, F., Goblet, D., Thonon, D., Plenevaux, A., Warnock, G., and Luxen, A. (2010) Fast Production of Highly Concentrated Reactive [18F] Fluoride for Aliphatic and Aromatic Nucleophilic Radiolabelling. *Tetrahedron Letters* 51, 64-66.
- (117) Lemaire, C. F., Aerts, J. J., Voccia, S., Libert, L. C., Mercier, F., Goblet, D., Plenevaux, A. R., and Luxen, A. J. (2010) Fast Production of Highly Reactive No-Carrier-Added [18F]Fluoride for the Labeling of Radiopharmaceuticals. *Angewandte Chemie International Edition* 49, 3161-3164.
- (118) Seimbille, Y., Phelps, M. E., Czernin, J., and Silverman, D. H. S. (2005) Fluorine-18 Labeling of 6,7-Disubstituted Anilinoquinazoline Derivatives for Positron Emission Tomography (PET) Imaging of Tyrosine Kinase Receptors: Synthesis of 18F-Iressa and Related Molecular Probes. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 48, 829-843.
- (119) Gobec, S., Kovac, A., Brajic, A., Pecar, S., Bostock, J., Chopra, I., Lenarsic, R., Bombek, S., Kocevar, M., and Polanc, S. (2008)

- Diazenedicarboxamides as Inhibitors of D-Alanine: D-Alanine Ligase.* EP 1 889 831 A2
- (120) Venkatesan, A. M., Chen, Z., Santos, O. D., Dehnhardt, C., Santos, E. D., Ayral-Kaloustian, S., Mallon, R., Hollander, I., Feldberg, L., Lucas, J., Yu, K., Chaudhary, I., and Mansour, T. S. (2010) PKI-179: An Orally Efficacious Dual Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20, 5869-5873.
- (121) Adamo, R., Allan, M., Berti, F., Danieli, E., and Hu, Q.-Y. (2011) *Tyrosine Ligation Process.* WO2012US45549
- (122) Efimov, V., Aralov, A., and Chakhmakhcheva, O. (2010) DNA Mimics Based on Pyrrolidine and Hydroxyproline. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 36, 663-683.
- (123) Ceulemans, G., Van Aerschot, A., Wroblowski, B., Rozenski, J., Hendrix, C., and Herdewijn, P. (1997) Oligonucleotide Analogues with 4-Hydroxy-N-acetylprolinol as Sugar Substitute. *Chemistry: An European Journal* 3, 1997-2010.
- (124) Westwood, N. B., and Walker, R. T. (1998) Synthesis and Biological Properties of a New Series of 5-Substituted-pyrimidine-L-Nucleosides Analogues. *Tetrahedron* 54, 13391-13404.
- (125) Booth, S., Wallace, E. N. K., Singhal, K., Bartlett, P. N., and Kilburn, J. D. (1998) Synthesis and Electrochemical Properties of Tetrathiafulvalene Derived Amino Acids and Peptides. *Journal of Chemical Society Perkin Transactions 1*, 1467-1474.
- (126) Wuts, P. G. M., and Greene, T. W. (2006) *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, 4th Edition.*
- (127) Lutsenko, S., Jacobsson, U., and Moberg, C. (2003) Preparation of L-Threoninol and Its Bisoxazoline Derivative. *Synthetic Communications* 33, 661-666.
- (128) Chang, M.-Y., Pai, C.-L., and Chen, H.-P. (2005) Synthesis of Streptorubin B Core. *Tetrahedron Letters* 46, 7705-7709.
- (129) Kamal, A., Srinivas, O., Ramulu, P., Ramesh, G., Kumar, P. P., and Kumar, M. S. (2004) Synthesis and DNA Binding Affinity of Novel A-C8/C-C2-exo Unsaturated Alkoxyamido-Linked Pyrrolo[2,1-c][1,4]Benzodiazepine Dimers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12, 4337-4350.
- (130) Tedeschi, T., Corradini, R., Marchelli, R., Pushl, A., and Nielsen, P. E. (2002) Racemization of Chiral PNAs During Solid-Phase Synthesis: Effect of the Coupling Conditions on Enantiomeric Purity. *Tetrahedron Asymmetry* 13, 1629-1636.
- (131) Folkersen, B. M., Lundt, I., Foged, C., and Valsborg, J. S. (1999) Preparation of ¹⁴C-labelled 1,4-Dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol: Cyanosilylation of Cyclic Imines using KCN in a One-Pot

- Synthesis. Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 42, 1145-1159.
- (132) Godskesen, M., Lundt, I., Madsen, R., and Winchester, B. (1996) Deoxyiminoalditols from Aldonolactones-V. Preparation of the Four Stereoisomers of 1,5-Dideoxy-1,5-Iminopentitols. Evaluation of these Iminopentitols and Three 1,5-Dideoxy-1,5-Iminoheptitols as Glycosidase Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 4, 1857-1865.
- (133) Bannwarth, W., and Knorr, R. (1991) Formation of Carboxamides with N,N,N',N'-tetramethyl(succinimido)uronium tetrafluoroborate in aqueous/organic Solvent System. *Tetrahedron Letters* 32, 1157-1160.
- (134) Nagao, Y., Seno, K., Kawabata, K., Miyasaka, T., Takao, S., and Fujita, E. (1980) Monitored Aminolysis of 3-Acylthiazolidine-2-Thione : A New Convenient Synthesis of Amide. *Tetrahedron Letters* 21, 841-844.
- (135) Christensen, J. B. (2001) A Simple Method for Synthesis of Active Esters of Isonicotinic and Picolinic Acids. *Molecules* 6, 47-51.
- (136) Wellendorph, P., Jaroszewski, J. W., Hansen, S. H., and Franzyk, H. (2003) A Sequential High-Yielding Large-Scale Solution-Method for Synthesis of Philanthotoxin Analogues. *European Journal of Medicinal Chemistry* 38, 117-122.
- (137) Katritzky, A. R., Shobana, N., Pernak, J., Afridi, A. S., and Fan, W.-Q. (1992) Sulfonyl Derivatives of Benzotriazole: Part 1. A Novel Approach to the Activation of Carboxylic Acids. *Tetrahedron* 48, 7817-7822.
- (138) Garbacki, N., Di Valentin, E., Piette, J., Cataldo, D., Crahay, C., and Colige, A. (2009) Matrix Metalloproteinase 12 Silencing: A Therapeutic Approach to Treat Pathological Lung Tissue Remodeling? *Pulmonary Pharmacology Therapeutics* 22, 267-278.
- (139) Demko, Z. P., and Sharpless, K. B. (2002) A Click Chemistry Approach to Tetrazoles by Huisgen 1,3-Dipolar Cycloaddition: Synthesis of 5-Sulfonyl Tetrazoles from Azides and Sulfonyl Cyanides. *Angewandte Chemie International Edition* 41, 2110-2113.
- (140) Berndl, S., Herzig, N., Kele, P., Lachmann, D., Li, X., Wolfbeis, O. S., and Wagenknecht, H. A. (2009) Comparison of a Nucleosidic vs Non-Nucleosidic Postsynthetic "Click" Modification of DNA with Base-Labile Fluorescent Probes. *Bioconjugate Chemistry* 20, 558-564.
- (141) Kiviniemi, A., Virta, P., and Lonnberg, H. (2008) Utilization of Intrachain 4'-C-Azidomethylthymidine for Preparation of Oligodeoxyribonucleotide Conjugates by Click Chemistry in

- Solution and on a Solid Support. Bioconjugate Chemistry* 19, 1726-1734.
- (142) Flagothier, J., Warnier, C., Dammicco, S., Lemaire, C., and Luxen, A. (2013) Synthesis of [18F]4-(4-Fluorophenyl)-1,2,4-Triazole-3,5-Dione: an Agent for Specific Radiolabelling of Tyrosine. *RSC Advances* 3, 24936-24940.
- (143) Flagothier, J., Kaisin, G., Mercier, F., Thonon, D., Teller, N., Wouters, J., and Luxen, A. (2012) Synthesis of Two New Alkyne-Bearing Linkers Used for the Preparation of siRNA for Labeling by Click Chemistry with Fluorine-18. *Applied Radiation and Isotopes* 70, 1549-1557.

7 Annexes

7.1 Annexe 1

Synthesis of [^{18}F]4-(4-Fluorophenyl)-1,2,4-Triazole-3,5-Dione: an Agent for Specific Radiolabelling of Tyrosine.

Flagothier, J., Warnier, C., Dammicco, S., Lemaire, C., and Luxen, A. (2013) RSC Advances 3, 24936-24940.

7.2 Annexe 2

Synthesis of Two New Alkyne-Bearing Linkers Used for the Preparation of siRNA for Labeling by Click Chemistry with Fluorine-18.

Flagothier, J., Kaisin, G., Mercier, F., Thonon, D., Teller, N., Wouters, J., and Luxen, A. (2012) Applied Radiation and Isotopes 70, 1549-1557.

