

Université
de Liège



FACULTE DE MÉDECINE
CENTRE DE RECHERCHES DU CYCLOTRON

**COMPOSÉS RADIOPHARMACEUTIQUES MARQUÉS
AU FLUOR-18 UTILISÉS EN ROUTINE CLINIQUE :
NOUVELLES MÉTHODES DE PRODUCTION
ET VALIDATION ANIMALE.**

Joël AERTS, Radiopharmacien

**Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques**

Promoteur : Prof. A. LUXEN

Année académique 2008-2009

« Mieux vaut tard que jamais » est certainement la meilleure expression pour décrire la chronologie de cette thèse. C'est en effet en décembre 1993, que le Professeur KULBERTUS, Président du conseil de gestion du Centre de Recherches du Cyclotron de l'Université de Liège, me signifiait qu'une bourse d'études de quatre ans m'avait été attribuée pour réaliser une formation de radiopharmacien et concrétiser un travail de recherches par un doctorat en sciences pharmaceutiques. Je commençai alors mon travail au CRC sous la direction du Professeur André LUXEN qui me chargea directement d'implémenter un système de qualité pour les composés radiopharmaceutiques fabriqués et utilisés au CRC. Ce ne fut pas tâche simple car, bien que la réputation du Centre pour l'intérêt de ses recherches radiochimiques et médicales fut déjà internationale à cette époque, l'esprit pharmaceutique était quasiment absent. Il ne fut pas aisé de modifier les habitudes de travail ancrées de longue date dans les laboratoires. Je pus néanmoins compter sur l'appui sans faille de la Direction, de la judicieuse sagesse du Professeur Charles FALLAIS et de l'aide de nombreux collègues aujourd'hui pensionnés ou toujours en poste. Ce travail collectif de longue haleine fut finalement concrétisé par la reconnaissance du CRC comme premier laboratoire TEP fabricant pharmaceutique et par l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché pour le FDG en 2002, historiquement la première en Belgique pour un produit marqué avec un émetteur de positon. Ces défis relevés, les charges de radiopharmacie liées aux productions furent réparties sur plusieurs têtes, celle de Charles FALLAIS et la mienne dès 2002. Le Pharmacien Christine MELLA nous a rejoint ensuite. Je pus donc me consacrer plus librement à cette thèse évoquée dans ma lettre d'engagement, à peine entamée au vingtième siècle pour ce qui concerne la validation animale de la fluorotyrosine. L'opportunité d'intégrer un projet de recherches européen ambitieux concernant l'utilisation des microréacteurs pour la pratique radiopharmaceutique TEP acheva de me remotiver dans le travail qui se concrétise aujourd'hui quinze ans après le départ.

L'heure est enfin aux remerciements.

En premier lieu, je désire souligner combien je suis redevable au Professeur FALLAIS d'avoir su me transmettre son amour de la Radiopharmacie. Sage parmi les gens du métier, encyclopédie de l'histoire du médicament radioactif, internationalement et unanimement apprécié pour sa gentillesse et sa modestie, il a su me conseiller et me soutenir depuis mon arrivée au CRC. Avoir un tel Maître est une chance rare.

Travailler avec André LUXEN est une occupation passionnante, apportant de nouveaux projets régulièrement. C'est un homme orchestre entreprenant que j'apprécie pour son honnêteté et qui me fait l'honneur de m'accorder son amitié. J'espère pouvoir encore relever de nombreux défis avec lui dans les prochaines années.

Madame Christine MELLA, après avoir suivi le cursus de Radiopharmacien, effort appréciable lorsque l'on est déjà dans la vie professionnelle depuis plusieurs années, a repris

la direction de l'assurance qualité des fabrications pharmaceutiques du CRC en temps opportun pour me libérer de cette lourde tâche.

Monsieur Steve LIGNON, technicien biochimiste, a supporté mes exigences durant trois années communes de pratique de laboratoire. Le sérieux qu'il porte à la réalisation de son travail est un atout très appréciable pour l'obtention des résultats.

Sans l'appui de ma famille et de ces quatre personnes, ce travail n'aurait jamais été concrétisé.

J'adresse un grand merci aux docteurs Christian LEMAIRE, Alain PLENEVAUX et Samuel VOCCIA (Trasis SA) pour leur soutien technique et moral lors de la réalisation de cette thèse.

Je voudrais également remercier tous les collègues avec qui j'ai partagé le travail ces dernières années au CRC, qu'il s'agisse de chercheurs ou de techniciens, tous ont toujours répondu présents lorsqu'un coup de main ou une idée était nécessaire.

Je remercie vivement les personnes des laboratoires universitaires extérieurs au CRC qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de cette thèse. Par ordre alphabétique : Mesdames et Messieurs les Professeurs P. BOBILLIER (Lyon, France), Y. CHAPLEUR (Nancy, France), B. EVRARD (ULg), P. HUBERT (ULg), R. HUSTINX (ULg), A. MAYES (Norwich, UK), ainsi que Mesdames et Messieurs M. DEJENEFFE (ULg), F. LECOMTE (ULg), F. LEONARD (ULg), C.RIVIERE (CHU) et C. VALA (Nancy, France)

Je termine cette liste forcément incomplète en remerciant les membres de mon comité de thèse, Messieurs les Professeurs BONIVER, DUMONT, PIROTTE et SMONS, pour la confiance accordée malgré la durée inhabituelle du travail réalisé.

Merci à tous ceux que j'ai oubliés, ne m'en veuillez pas de trop.

Bonne lecture à tous ceux qui s'aventureront dans ces lignes.

Joël Aerts, Novembre 2008.

Pour tout contact : j.aerts@ulg.ac.be

Les grandes étapes dans l'organisation de ce travail:

INTRODUCTION GENERALE	page 2
▶ Organisation et but général du travail	19
SECTION I: Métabolisme de la 2-[¹⁸F]fluoro-L-tyrosine	page 25
▶ But spécifique dans cette section	36
▶ Conclusions de cette section	47
SECTION II: Implémentation des polymères à empreinte moléculaire	page 52
▶ But spécifique dans cette section	63
▶ Conclusions de cette section	89
SECTION III: Préparations et mise en œuvre sans évaporation de [¹⁸F]fluorure réactionnel pour les substitutions nucléophiles aliphatiques et aromatiques	page 99
▶ But spécifique dans cette section	143
▶ Conclusions de cette section	269
RESUME & CONCLUSIONS	page 285
ABREVIATIONS & ANNEXES	page 287
SUMMARY	page 329
TABLE DES MATIERES	page 330

INTRODUCTION GENERALE

Pour vous orienter dans cette partie:

INTRODUCTION	page
▶ Le traceur émetteur de positon dans le contexte actuel	3
▶ Organisation et but général du travail	19
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	page 22

Le traceur émetteur de positon dans le contexte actuel

Le traçage physico-chimique est défini comme l'action de suivre le déplacement de matière dans un système dynamique, par exemple lors du déroulement d'une réaction chimique, lors de la dispersion d'un produit dans l'environnement ou lors de l'administration d'un médicament à un patient. A l'échelle subcellulaire, le traçage nécessite l'utilisation d'un traceur, c'est-à-dire une entité chimique aisément détectable et identifiable par un processus physico-chimique adapté pour l'étude du phénomène dynamique considéré. Le traceur ne doit pas influencer son déroulement, mais simplement permettre l'obtention d'informations. En conséquence, il est en général utilisé « à l'état de traces ». Le traceur est toujours constitué d'un marqueur, le plus souvent supporté par un vecteur, formant avec lui une structure le plus souvent moléculaire ou plus complexe (nano-plateformes). Lorsque le marqueur est un nucléide émetteur de positon, en général couplé à un vecteur organique lors du processus de marquage d'un précurseur, on parle de traceur émetteur de positon.

De nos jours, ce type de traceur est utilisé en médecine nucléaire diagnostique pour la tomographie à émission de positon (TEP). Le concept d'imagerie moléculaire est défini comme la visualisation de processus biologiques *in vivo*, à un niveau moléculaire ou cellulaire, à l'aide de sondes spécifiques (moléculaires ou plus complexes). La TEP est une des principales techniques appliquées dans ce contexte [Ametamey 2008, Levin 2005]. Le traceur émetteur de positon, que nous désignerons aussi par traceur TEP, constitue donc le principe actif d'un produit destiné à être administré à l'homme à des fins diagnostiques. Tenant compte de la définition légale du médicament, ce produit administré rejoint sans aucun doute le groupe des produits médicamenteux. Le médicament radiopharmaceutique possède par ailleurs sa propre définition légale (« tout médicament qui, lorsqu'il est prêt à l'emploi, contient un ou plusieurs radionucléides (isotopes radioactifs), incorporés à des fins médicales » [MB 2006]). En conséquence, le traceur TEP et le produit fini qui le contient doivent suivre les contraintes de fabrication imposées aux médicaments.

Le traceur TEP, par les propriétés physiques du radionucléide qui l'intègre, est assurément un principe actif bien particulier. Un premier aspect important est la véritable « course contre la montre » qui s'impose lorsque l'on travaille avec un radionucléide émetteur de positon, caractérisé par une courte période. Même dans le cas le moins défavorable du fluor-18 (période : 109,8 minutes), une stricte organisation de la fabrication, de la livraison et de l'utilisation est nécessaire. A titre d'exemple, la figure i.1 montre l'organisation horaire de la fabrication du deuxième lot quotidien de 2-désoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose ([¹⁸F]FDG, figure i.2) au Centre de Recherches du Cyclotron (CRC) de l'Université de Liège. Le schéma de synthèse de ce traceur se trouve en l'annexe Ai.1 [Lemaire 2002].

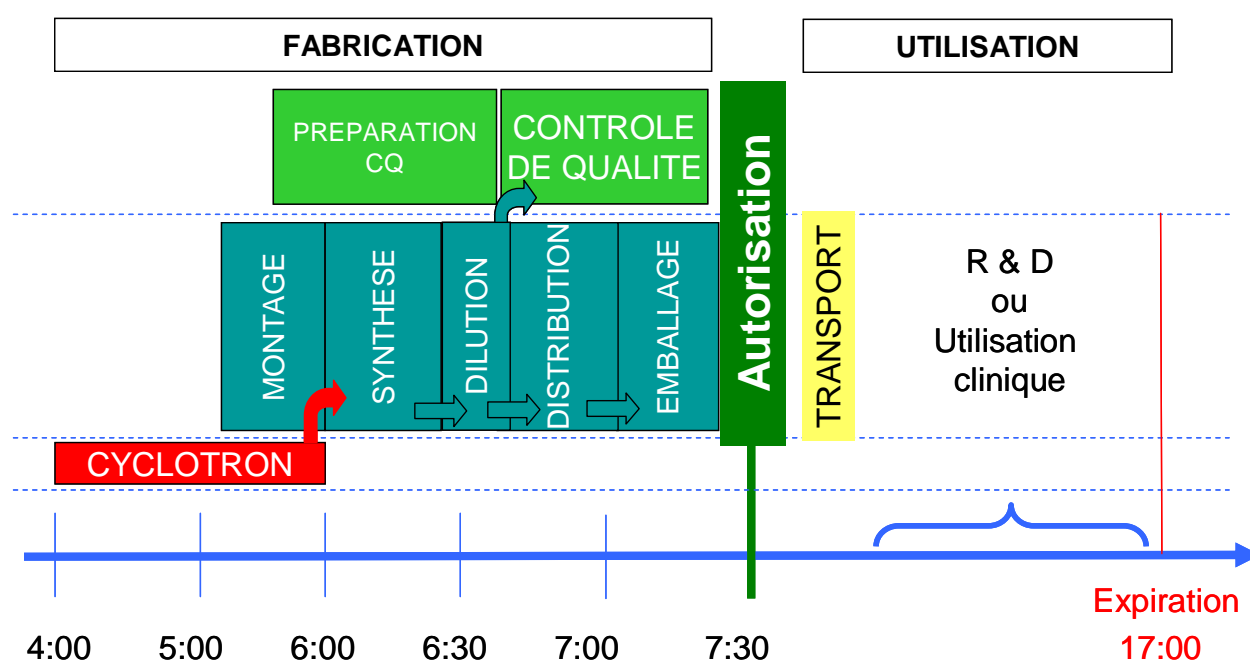


Figure i.1 Organisation de la fabrication [¹⁸F]FDG au CRC, 2^{ème} lot.

Détails de la partie fabrication :

En rouge : production du fluor-18 par le cyclotron.

En bleu : tâches de production

En vert : tâches de contrôle de qualité

Ce type d'organisation est applicable à la fabrication d'un lot (fabrication multi-clients), d'environ 10 flacons multi-doses contenant un traceur TEP marqué au fluor-18, de concentration radioactive calibrée à heure fixe, fabriqué dans des conditions respectant les bonnes pratiques de fabrication (BPF) pharmaceutiques [Eudralex 2003]. Il faut remarquer, dans cette organisation, la proportion de temps relativement faible réservée à la synthèse du principe actif, ce qui est le reflet du développement quasi optimal de la chimie et de l'automation dans le cas de ce traceur. Actuellement, l'étape limitatrice du processus est constituée par une étape post-synthèse qui est soit le contrôle de qualité (CQ) physico-chimique (le CQ microbiologique ayant lieu dans les semaines qui suivent), soit le contrôle « in process » de l'intégrité des filtres de distribution (test du point de bulles). L'ordre chronologique de la fin du CQ et du test des filtres dépend de la durée de la distribution, donc du nombre de flacons à remplir.

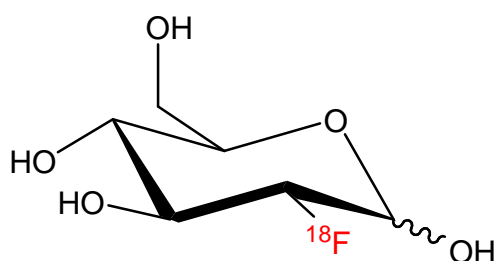


Figure i.2 2-désoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose, [¹⁸F]FDG.

Un autre aspect important, différenciant le médicament radiopharmaceutique des autres médicaments, est le risque d'exposition des travailleurs et de la population aux radiations ionisantes, à la fois de nature particulière et électromagnétique dans le cas particuliers des traceurs TEP. Ces caractéristiques imposent des contraintes de radioprotection sévères [MB 2001]. Si le médicament radiopharmaceutique bénéficie d'un régime particulier pour sa distribution par le fait de sa livraison directe par le fabriquant à l'utilisateur agréé, il n'existe pas, par contre, de facilités particulières accordées aux médicaments radiopharmaceutiques contenant un radionucléide de courte période, pour leurs contraintes de fabrication selon les BPF [Eudralex 2003]. Certes, l'annexe 3 (« Fabrication des produits radiopharmaceutiques ») prévoit bien de permettre l'utilisation du produit avant complétude de certains tests nécessitant un long temps de réalisation (par exemple le test de stérilité), mais l'annexe 1 (« Fabrication des produits médicamenteux

stériles ») reste d'application. Certaines règles pharmaceutiques s'opposent à celles régissant la protection des travailleurs exposés. Ainsi, une zone de fabrication dans laquelle une filtration aseptique est pratiquée doit, selon les BPF, être placée en surpression par rapport aux zones environnantes (protection du produit), alors que les règles de radioprotection recommandent de limiter les risques d'exposition des travailleurs en confinant les produits radioactifs dans des zones en dépression. Par ailleurs, étant donné les valeurs et la qualité des activités manipulées lors de ces fabrications (plusieurs curies de fluor-18, rayonnement électromagnétique de 511 KeV), des blindages en plomb d'épaisseur importante, avec une pose dans les trois dimensions autour des automates, sont nécessaires pour protéger le personnel. Le poids qui en résulte est un facteur très contraignant d'un point de vue physique (manipulations répétées d'objets très lourds), aussi bien que d'un point de vue coûts d'installation et de maintenance.



Figure i.3a Le premier synthétiseur de [^{18}F]FDG, 1978 [Ido 1978]

Picture reprinted with the kind authorisation of Professor J. FOWLER, Brookhaven National Laboratory, New York, USA.

Deux facteurs extrêmement importants sont donc à prendre en considération dans le cadre du développement ou de l'amélioration du processus de fabrication d'un traceur TEP : le temps et l'espace. Idéalement, l'optimisation des processus de fabrication doit aller dans le sens de la diminution des grandeurs s'y rapportant : la durée et les dimensions.

L'effet positif de la réduction de la durée des processus est évident si l'on se rappelle que les émetteurs de positon utilisés en médecine nucléaire sont caractérisés par des périodes radioactives très courtes (oxygène-15 : 122,24 s, azote-13 : 9,965 min., carbone-11 : 20,39 min., fluor-18 : 109,77 min. [Firestone 1996]). Ainsi un gain de temps de 10 minutes permet de gagner 6,5% d'activité en fluor-18 et 40,5% en carbone-11. Mais inversement, un retard de 10 minutes conduit à une perte de 6,1% d'activité en fluor-18 et de 28,8% en carbone-11. Toutes les étapes, entre l'arrêt de fonctionnement du cyclotron et la livraison à l'utilisateur, sont concernées, notamment celles sur lesquelles il est impossible d'exercer un contrôle strict (le transport routier par exemple). Cette notion de diminution absolue de la durée de synthèse doit bien sûr être nuancée par les données de rendements de synthèse. Ainsi, une amélioration technique (voie de synthèse, automation) peut conduire à une augmentation de la durée totale d'une fabrication, mais être compensée par un meilleur rendement de marquage ou une meilleure récupération du produit marqué, conduisant globalement à un rendement non corrigé plus élevé.

L'effet positif de la réduction des dimensions tient aux avantages techniques qui en découlent :

- la miniaturisation, en général couplée à une meilleure automation, permet une organisation spatiale plus simple, qui allège les investissements et les coûts de maintenance. Les zones pharmaceutiques critiques sont plus limitées dans l'espace, ce qui limite les frais liés à l'environnement contrôlé obligatoire.
- les quantités de matières mises en œuvre sont en général moindres (solvants, réactifs), ce qui a un impact économique et écologique positif.

- le volume de matériel (raccords, tubes, réacteurs, vannes...) diminue, donc celui des déchets solides à éliminer également. Ceci permet l'utilisation de matériel à usage unique, plus fiable, et limite les problèmes liés au nettoyage et à sa validation.
- les systèmes pré-montés, contenant même parfois les réactifs prêts à l'emploi, peuvent être envisagés, ce qui simplifie les procédures de fabrication et améliore l'observance aux BPF.

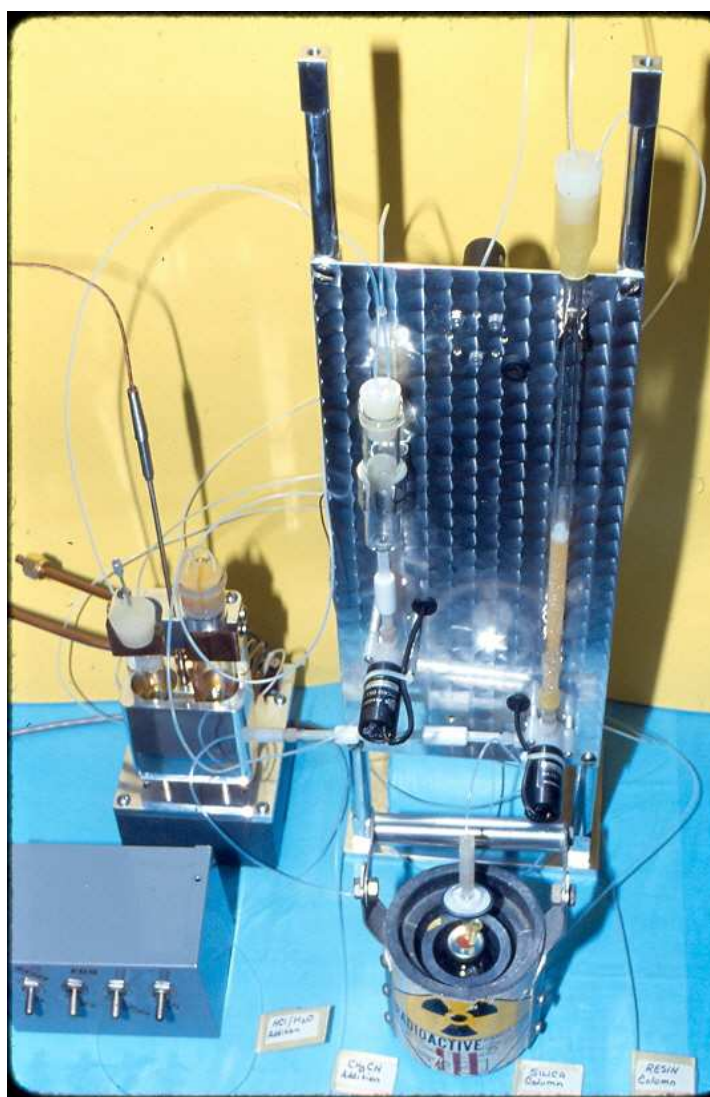


Figure i.3b Prototype du premier automate de synthèse nucléophile du [^{18}F]FDG, 1989 [Padgett 1989]

Image provenant de la collection personnelle du Professeur A. LUXEN.

L'histoire du [^{18}F]FDG est un bon exemple de progrès techniques réalisés dans le domaine de la chimie TEP, conduisant à l'utilisation de systèmes de plus en plus compacts. Initialement basée sur l'utilisation de fluor électrophile [Casella 1980], la synthèse est aujourd'hui exclusivement réalisée au départ de fluorure nucléophile [Tewson 1989]. La figure i.3 (a, b, c) montre l'évolution des appareils utilisés.



Figure i.3c Le standard actuel : boîte « Coïncidence » développée au Centre de Recherches du Cyclotron de l'Université de Liège par J.L. MORELLE et C. LEMAIRE.

Cet automate est aujourd'hui commercialisé par GE Medical System Benelux, <http://www.gehealthcare.com/befr/index.html> sous le nom de TracerLab MX.

Le tableau i.4 reprend quelques étapes majeures de l'évolution de la synthèse de cette molécule jusqu'à l'automate TracerLab MX, standard mondial actuel.

REF	Caractéristiques (E : électrophile ; N : nucléophile)	Rendement NC (C) *	Durée (>EOB)	Avantages
Ido 1977, 1978	E, Première synthèse [¹⁸ F]FDG, fig. i.3a	8 %	> 1H	
Adam 1984	E, Introduction des cartouches d'extraction en phase solide de type C18 pour la concentration et purification du produit marqué	20 (28) %	50 min.	Plus d'évaporation après marquage
Hamacker 1986	N, Introduction du triflate de tétraacétylmannose comme précurseur du [¹⁸ F]FDG et du cation K/K222+ comme contre-ion du [¹⁸ F]F ⁻	44 (59) %	45 – 50 min.	Obtention d'un traceur de haute activité spécifique avec un intermédiaire marqué facilement hydrolysable.
Schlyer 1987	Introduction de la récupération du [¹⁸ F]F ⁻ sur résine échangeuse d'ions.	> 95% (récupération seule)	5 min.	Séparation du [¹⁸ F]F ⁻ de H ₂ ¹⁸ O sans évaporation, récupération de H ₂ ¹⁸ O, élimination des cations provenant des cibles.
Padgett 1989	N, Premier automate de synthèse nucléophile, fig. i.3b	40 (55) %	50 – 55 min.	Automatisation augmentant la reproductibilité et diminuant l'exposition du personnel
Füchtner 1996	N/E, Déprotection par hydrolyse basique à la place de l'hydrolyse acide (à ébullition).	100 % (hydrolyse seule)	1 min.	Gain de temps résultant en un gain de rendement global de 6-13%
Lemaire 2002	N, Hydrolyse sur support solide	70 (85) %	0H30	Purification du produit marqué sur support (concentration) avant hydrolyse rapide à froid.
2000	N, Lancement du synthétiseur « Coïncidence » (actuellement TracerLabMX), fig. i.3c	70 (85) %	0H30	Matériel à usage unique. Haute robustesse en termes de rendement et de qualité du produit fini.

Tableau i.4

Quelques étapes importantes dans l'histoire du [¹⁸F]FDG

* non corrigé (corrigé EOB)

Nous avons déjà rappelé les effets de 10 minutes de retard lors de la fabrication d'un traceur TEP. Cet exemple illustre bien la frontière existant entre, d'une part, le fluor-18 (6,1% de pertes) et, d'autre part, les autres émetteurs de positon courants, dont le carbone-11 (28,8% de pertes). La période du carbone-11 le rend incompatible (ou très difficilement compatible) avec une série d'applications :

- toutes les applications médicales qui procèdent par l'observation d'un phénomène dont la cinétique est lente, devant se prolonger au-delà d'une heure après administration du traceur ;
- toutes les applications devant être réalisées en dehors du site de fabrication, c'est-à-dire nécessitant un transport. Les applications industrielles, le plus souvent garantes de la rentabilité des services équipés d'un cyclotron, sont pratiquement impossibles ;
- toutes les applications pour lesquelles une contrainte de temps particulière est imposée. Un exemple actuel réel pour le CRC : un essai clinique pour l'industrie pharmaceutique actuellement réalisé avec un traceur marqué au fluor-18 pour lequel il nous est imposé de réaliser un test des endotoxines avant utilisation du produit. La durée du test par la méthode de gélification est au minimum de 60 minutes et les techniques plus nouvelles de colorimétrie (durée de l'ordre de 15 minutes) n'ont pu être utilisées en raison d'interférences avec le processus enzymatique.

Le carbone-11 et les autres radionucléides de courte période sont donc réservés à l'utilisation immédiate sur le site de fabrication, ce qui impose la disponibilité, sur ce site, d'une capacité d'imagerie TEP. Par exemple, un essai clinique multicentrique basé sur ce radionucléide nécessiterait autant de cyclotrons, autant de zones de production répondant aux BPF, autant de laboratoires de CQ respectant un manuel de qualité, que de sites d'imagerie inclus dans l'étude.

Ces inconvénients majeurs du carbone-11 par rapport au fluor-18, renforcés par d'autres caractéristiques avantageuses de ce dernier (productivité des cyclotrons, haute activité spécifique, qualité des images TEP), font que le CRC a, actuellement, opté pour l'utilisation unique du fluor-18 comme marqueur pour ses développements de traceurs TEP.

Quant à lui, le fluor-18 présente un inconvénient lié à l'absence quasi généralisée du fluor dans les organismes vivants, malgré une occurrence naturelle importante pour cet élément. Quelques produits mono-fluorés ont été découverts dans des bactéries ou des végétaux supérieurs [Dolbier 2005], dont le fluoroacétate qui leur sert d'anti-herbivore naturel par son effet toxique par perturbation du cycle de Krebs [Klingensmith 1945]. Néanmoins, des molécules fluorées sont utilisées comme principes actifs de nombreux médicaments, avec une proportion d'environ 20% de l'ensemble des molécules utilisées et comprennent certains leaders commerciaux (fluoxétine, atorvastatine, ciprofloxacine) [Müller 2007]. Il en résulte que les traceurs TEP marqués au fluor-18 seront, au mieux identiques à des molécules médicamenteuses artificielles, parfois analogues de molécules biologiques, mais souvent structurellement différents de celles-ci.

Les principes actifs fluorés et les analogues de molécules biologiques peuvent résulter de l'application du concept de bioisostérisme, qui fait référence à la capacité de groupes fonctionnels qui présentent des similarités en termes de taille, de forme et de distribution électronique, à pouvoir être échangés sans altération majeure de l'activité biologique [Patani 1996]. Le remplacement d'un hydrogène par un fluor a été largement utilisé sur base de paramètres stériques supposés similaires. Les études les plus récentes suggèrent, sur base des rayons de van der Waals de F, O et H (respectivement 1,47; 1,52 et 1,2 Å), que la liaison C-F est plutôt isostère de la liaison C-O que de la liaison C-H (longueurs respectives 1,41 ; 1,43 ; et 1,09 Å) [Müller 2007]. Le fluor reste néanmoins le plus petit substituant pouvant remplacer l'hydrogène dans les molécules organiques. Son effet stérique sur un processus particulier dépend de la nature de l'état de transition impliqué et peut donc être éventuellement absent.

D'autre part, à côté de sa petite taille, d'autres caractéristiques, comme sa forte électronégativité, sa faible polarisabilité, la présence de trois paires d'électrons non liants très liées au noyau et un excellent recouvrement orbitalaire (2s, 2p) avec les autres atomes de la seconde période, influencent l'effet de la présence du fluor sur l'activité biologique d'une molécule. Des propriétés importantes des molécules s'en trouvent en effet modifiées [Smart 2001]. Ainsi, la lipophilie augmente suite à la fluoration, sauf dans le cas de la monofluoration ou trifluorométhylation de groupes alkyles saturés. Le fluor possède toujours un effet inductif électroattracteur important. Son effet donneur par résonance est moyen (inférieur à celui de l'oxygène dans un groupe hydroxyle, mais supérieur à celui des autres halogènes). Les liaisons hydrogènes avec le fluor sont plus faibles qu'avec les autres hétéroatomes, en conséquences de sa faible polarisabilité et du caractère non liant des ses paires libres.

Les applications actuelles des traceurs TEP marqués au fluor-18 se répartissent en deux groupes en fonction du type d'informations recherchées, c'est-à-dire concernant :

- un processus biologique particulier, à des fins de recherches fondamentales ou son évolution, à des fins de diagnostic. Dans ce cas, des traceurs qui sont susceptibles d'intervenir dans le processus en question seront utilisés;
- l'entité chimique marquée elle-même, à des fins de développement et d'études pharmacocinétiques d'un principe actif non radioactif.

Jusqu'à présent, c'est surtout le **premier groupe** d'applications qui a été développé par la communauté TEP. Dans ce groupe, on distingue les traceurs « généralistes », relatifs à des processus cellulaires non spécifiques (synthèse des protéines, transports transmembranaires...). Un exemple est le « leader mondial » des traceurs TEP, le [^{18}F]FDG (fig. i.2), dont les applications sont très diverses (oncologie, neurologie, cardiologie), du fait de la généralisation tissulaire du phénomène qu'il trace (le transport intracellulaire de glucose). Dans la section III de ce travail, le marquage conduisant à ce traceur important sera utilisé pour tester l'efficacité des améliorations proposées pour la récupération du [^{18}F]fluorure.

D'autre part, certains traceurs, qualifiés de « spécifiques », ont été façonnés pour obtenir une spécificité optimale pour le suivi d'un phénomène particulier, par exemple la liaison à un récepteur biologique. Un exemple est le p -[^{18}F]MPPF, dont il sera question dans la section II de ce travail, antagoniste spécifique des récepteurs 5HT $_{1A}$ [Le Bars 1998].

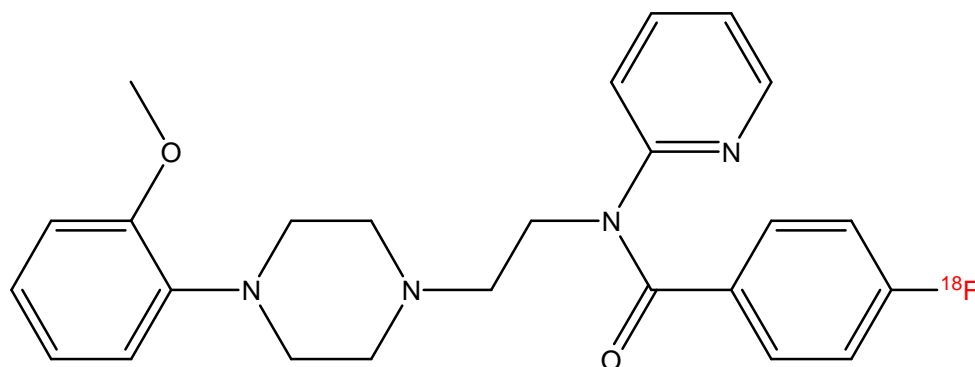


Figure i.5 p -[^{18}F]MPPF
4-(2'-méthoxyphényl)-1-[2'-[N -(2''-pyridinyl)- p -[^{18}F]fluoro-benzamido]éthyl]-pipérazine

Traceurs « généralistes » et « spécifiques » se complètent en termes d'indications au sein d'ensembles à même visée diagnostique. Un exemple de cette complémentarité est la diversité des traceurs pour l'imagerie tumorale [Couturier 2004]. La 2-[¹⁸F]fluoro-L-tyrosine, sujet de la section I de ce travail, est un exemple de traceur généraliste pour la synthèse des protéines, processus tissulaire généralisé. En parallèle, des traceurs ont été développés pour l'imagerie spécifique de certains récepteurs, par exemple le [¹⁸F]fluoro-octéotide pour le récepteur à la somatostatine.

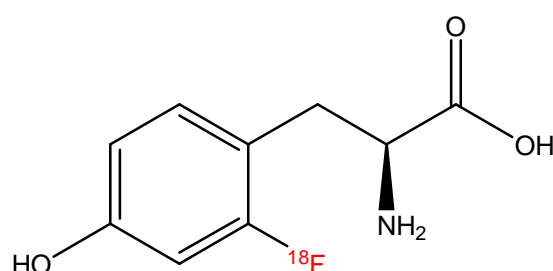


Figure i.6 2-[¹⁸F]fluoro-L-tyrosine

Durant les dernières années, le marquage de peptides et de protéines est devenu un outil de pointe pour l'imagerie spécifique de certains processus par la TEP [Wuest 2008]. Les conditions classiques de marquage à haute activité spécifique (chauffage, solvants organiques) sont peu compatibles avec la fragilité de ce type de précurseurs. La chimie TEP se tourne donc actuellement vers le marquage bifonctionnel. Dans cette approche, le fluor-18 est d'abord incorporé, en conditions habituelles, à une petite molécule organique, pour donner un groupe prosthétique qui sera ensuite lié aux molécules à marquer, dans des conditions plus douces compatibles avec leur intégrité. En particulier, les réactions de la chimie « click » [Moses 2007, Marik 2006] sont bien adaptées pour ce couplage en conditions douces. La chimie de coordination du gallium-68 se développe quant à elle en parallèle pour tirer parti de sa disponibilité sous forme de générateur (⁶⁸Ge-⁶⁸Ga) et dans le but de développer des méthodes simples de marquage de peptides avec un émetteur de positon [Maecke 2005].

Le **second groupe** d'applications tient au fait que, depuis peu, de manière étonnement tardive, la TEP a été identifiée par l'industrie pharmaceutique comme un outil très intéressant pour étudier précocement le comportement *in vivo* chez l'humain de molécules en cours de développement. Cette technique d'imagerie permet en effet, grâce à sa haute sensibilité et à la haute activité spécifique des traceurs, d'obtenir des informations pharmacocinétiques précises en administrant de petites quantités de matière biologiquement active, limitant ainsi le risque toxique [Bergström 2003]. Notre produit passe-t-il la barrière hémato-encéphalique [Ohtsuki 2004] ? Se concentre-t-il de manière inattendue dans une certaine partie de l'organisme ? Quelles sont les molécules connues capables de modifier cette répartition ? Voilà une série de questions auxquelles il est potentiellement possible d'apporter des éléments de réponse significatifs grâce à la TEP. Des décisions sur l'intérêt de poursuivre ou non le développement d'un principe actif peuvent alors être prises précocement, limitant ainsi les coûts et les retards indésirables. Pour atteindre cet objectif, plusieurs conditions sont néanmoins nécessaires. La première est la représentativité du traceur pour la molécule développée. S'il s'agit d'un analogue fluoré, de longues validations seront en général nécessaires. L'idéal est donc que la molécule testée comporte un noyau fluor dans sa structure. Une autre condition est que le traceur doit pouvoir être facilement synthétisé, ce qui nécessite la disponibilité d'un précurseur réactionnel pour la substitution nucléophile. La position et le type de fluor (aliphatique, aromatique) présent dans la molécule doivent donc être choisis pour faciliter la synthèse du précurseur et activer sa réactivité. Il est dès lors compréhensible que l'industrie pharmaceutique envisage depuis peu de choisir initialement une partie de la structure des nouvelles molécules dans le but d'obtenir facilement cette potentialité de marquage.

En supplément aux traceurs moléculaires, bien établis notamment dans la technologie TEP [Ametamey 2008], l'avènement de technologies nouvelles peut induire l'apparition de pans entiers de nouvelles modalités d'imagerie moléculaire. Ainsi en est-il des nanotechnologies grâce auxquelles sont actuellement développées des nano-plateformes pour l'application dans de nombreuses techniques d'imagerie (optique, ultrasonore, magnétique et nucléaire) [Cai 2007]. Les structures développées ont des tailles 100 à 10000 fois plus petites que les cellules

humaines et permettent de faire cohabiter différentes fonctionnalités, par exemple une capacité de chélation pour un radionucléide et une fonction de ciblage biochimique (une structure peptidique), en forte concentration au sein d'une même nano-plateforme. Dans ce cadre aussi, la modalité TEP se distingue à nouveau par sa haute sensibilité et sa pertinence au point de vue quantitatif.

L'objectif de ces développements technologiques est de contribuer à l'établissement de la médecine personnalisée (« Personalized medicine ») qui, faisant suite au décodage du génome humain, envisage l'utilisation des informations génotypiques particulières des patients pour en effectuer une classification précise et appliquer une stratégie adaptée pour la prévention, la détection et le traitement des maladies, en particulier le cancer [Sikora 2007]. L'imagerie moléculaire permet de compléter la connaissance des maladies en relevant des informations phénotypiques spécifiques. Cet outil, dont la TEP fait partie intégrale, se révèle donc comme un complément inéluctable de l'analyse génotypique (*).

Malgré ses hautes performances, l'utilisation de la TEP à grande échelle est en pratique aujourd'hui limitée au [^{18}F]FDG. Différentes raisons sont invoquées pour expliquer cette restriction. Elles sont liées d'une part aux difficultés inhérentes à la fabrication du traceur TEP (production du radionucléide, chimie de synthèse, coût et radioprotection) et d'autre part aux contraintes réglementaires [Nutt 2007]. La législation européenne, notamment celle traitant des essais cliniques, est perçue comme un frein à l'innovation menant à la « personalized medicine » [Sikora 2007]. Le même genre d'effet ralentisseur est reproché à la FDA américaine en raison de l'absence de différenciation des processus d'admission des médicaments classiques et des traceurs TEP [Nutt 2007]. La situation est identique en Europe.

(*) relevons l'ironie du fait que la pharmacologie, moléculaire par essence, se donne comme objectif à moyen terme d'atteindre, dans la réalité expérimentale, l'adéquation parfaite d'une drogue à un patient particulier, ce que la « pharmacologie » non moléculaire, également baptisée homéopathie par son inventeur [Hahnemann 1810] et si bien décrite par un illusionniste renommé [Randi 2001], prétend indûment réaliser depuis longtemps.

Dans ce contexte d'individualisation des traitements, qui nécessite en parallèle la disponibilité d'une grande diversité de biotraceurs, la miniaturisation continue à être une des voies de progression potentielle pour la chimie TEP. La faisabilité de l'application des principes de microfluidique [Ong 2008] à la synthèse du [^{18}F]FDG a été démontrée [Lee 2005] (fig. i.7).

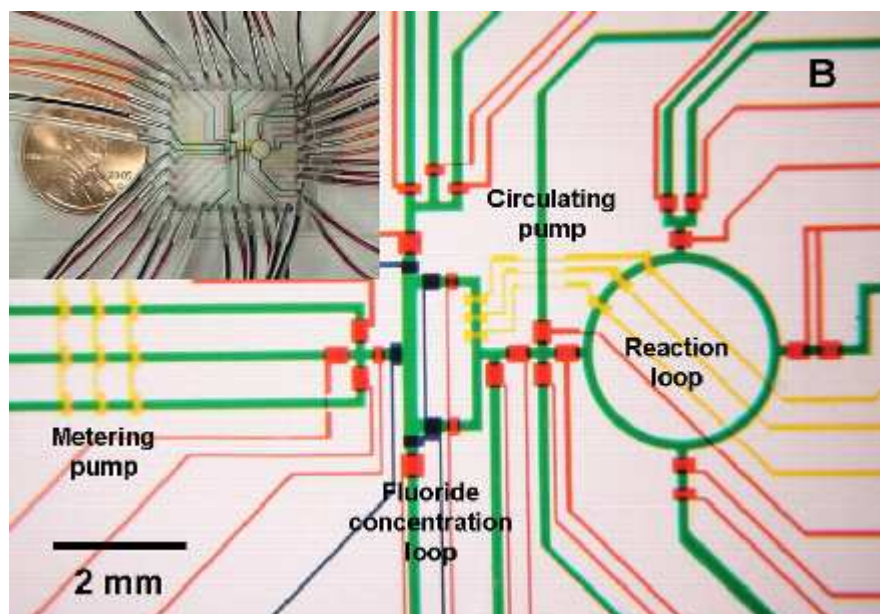


Figure i.7 Le premier microréacteur pour la synthèse du [^{18}F]FDG.

From Lee C. et al, "Multistep synthesis of a radiolabeled imaging probe using integrated microfluidics.", Science 2005; 310: 1793-1796. Reprinted with permission from AAAS.

Pour d'autres traceurs aussi (3-désoxy-3[^{18}F]fluorothymidine [^{18}F]FLT, [^{18}F]fluoromisonidazole [^{18}F]MISO) [Nutt 2007], la diminution d'échelle s'accompagnerait d'une augmentation des rendements de synthèse et ramèrerait sa durée à quelques minutes. La diminution des quantités de précurseur non radioactif, parfois d'un facteur 1000, permettrait la facilitation des processus de purification à mettre en œuvre pour atteindre les critères de qualité requis. Cette miniaturisation des systèmes de synthèse pourrait s'accompagner d'une diminution d'échelle dans la taille des cyclotrons. Des petits cyclotrons auto-blindés, travaillant à faible courant d'irradiation (1 μA), combinés à une station de synthèse, permettraient la fabrication à la demande de formes individuelles de divers traceurs, idéalement en une vingtaine de minutes.

Organisation et but général du travail

La chronologie théorique des événements se succédant dans l'existence d'un traceur TEP est résumée dans la figure i.8.

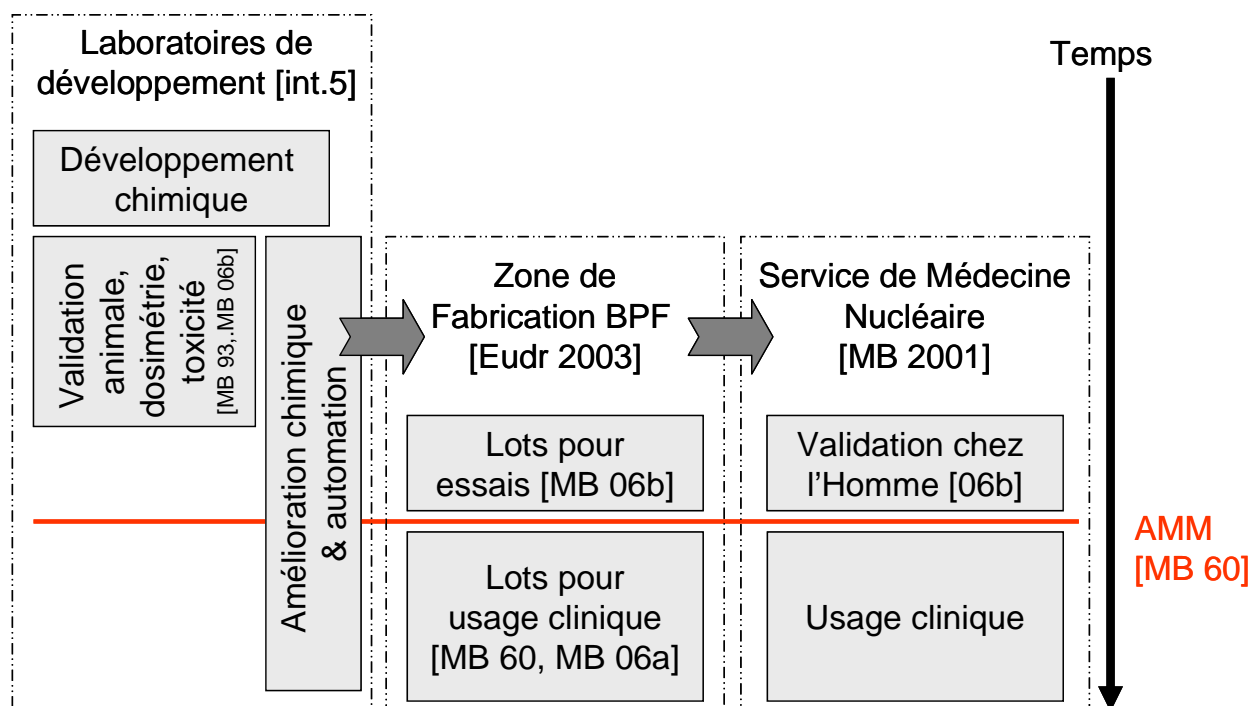


Figure i.8 Les événements de l'existence d'un traceur TEP répartis dans le temps (verticalement) et l'espace (horizontalement), avec référence aux principales législations belges concernées.

Le travail expérimental rapporté dans ce mémoire concerne le développement des traceurs TEP (rectangle de gauche de la figure i.8) et plus particulièrement les étapes de validation animale (2-[¹⁸F]fluoro-L-tyrosine) et d'amélioration chimique, dont la récupération du [¹⁸F]⁻ et le marquage appliqués au 2-désoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose. En parallèle à ce travail de développement, nous avons eu l'opportunité de participer activement à l'établissement matériel et fonctionnel de l'activité pharmaceutique au CRC, aujourd'hui fabricant autorisé par les autorités pharmaceutiques belges (N°1550), ainsi qu'à l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) européen pour le [¹⁸F]FDG, en collaboration étroite avec la firme pharmaceutique MDS-Nordion SA de Fleurus, Belgique.

L'ensemble de ce travail vise donc la mise à la disposition des services utilisateurs (rectangle de droite de la figure i.8) de médicaments radiopharmaceutiques de haute qualité, dans le meilleur respect des législations pertinentes en la matière. Seule la partie expérimentale relative au développement vous est présentée ici. Elle a pour but général de contribuer à renforcer les connaissances sur les traceurs TEP et leurs méthodes de fabrication.

La partie du travail concernant l'amélioration chimique de la méthode de synthèse du [^{18}F]FDG fait partie d'un projet de recherche européen ambitieux [EU 2002] concernant l'implémentation de processus de synthèse dans des dispositifs appliquant les principes microfluidiques (concept « Lab-on-a-chip » [Erickson 2004]). S'inscrivant dans la suite logique de la miniaturisation des synthétiseurs, elle devrait permettre une réduction importante des quantités de substrat de marquage à mettre en œuvre. Cette possibilité est très importante dans le cadre de l'obtention de produits intermédiaires marqués au fluor-18, envisagés comme groupe prosthétique pour le marquage de protéines. Ces intermédiaires devront présenter un très haut degré de pureté et une activité spécifique biologique élevée. Or, en considérant la synthèse actuelle du [^{18}F]FDG, donnant un produit de très bonne pureté radiochimique et de haute activité spécifique analytique, on doit constater que la pureté chimique de ce produit est perfectible et qu'avec les quantités de glucose qui résultent des processus de marquage et d'hydrolyse (de 2,5 à 3,5 mg par lot), l'activité spécifique biologique effective du [^{18}F]FDG est très basse. Pour l'application actuelle du traceur, analogue d'une molécule normalement circulante, cela n'a guère de conséquences, mais dans le cadre de marquage de peptides artificiels, ce niveau de qualité n'est pas suffisant.

Outre la réduction des quantités de substrat de marquage, une autre option pour améliorer l'activité spécifique, l'adjonction de techniques chimiques de purification [Yoshida 2002] visant à éliminer le précurseur non marqué, a été envisagée initialement dans ce projet « Lab-on-a-chip ». C'est le cas des polymères à empreinte moléculaire [Tamayo 2007] pour leur capacité d'interaction spécifique avec certains substrats, ainsi que des composés perfluorés [Ubeda 2006] qui présentent des propriétés d'interaction particulières.

Les polymères à empreinte moléculaire ont été envisagés comme une section séparée, car il s'agit de l'implémentation au CRC d'une technique existante non encore appliquée en radiochimie TEP, qui peut servir dans différents aspects du travail de développement et de validation d'un traceur, par exemples la purification d'un milieu de marquage pour éliminer le précurseur non marqué ou la concentration d'un analyte particulier dans le cadre d'études métaboliques.

L'importance, cruciale dans le cadre de la microfluidique, de disposer d'une méthode de mise en œuvre du [^{18}F]fluorure sans évaporation sera expliquée dans l'introduction relative à la section III.

Ce mémoire s'organise donc en trois sections :

- I. FTYR Métabolisme de la 2- ^{18}F fluoro-L-tyrosine
- II. MIP Implémentation des polymères à empreinte moléculaire
- III. ^{18}F Préparations et mise en œuvre de [^{18}F]fluorure réactionnel pour les substitutions nucléophiles aliphatique et aromatique sans évaporation.

Les buts spécifiques poursuivis dans chaque section seront décrits dans l'introduction de chacune d'elles.

Il faut constater avec plaisir combien la médecine nucléaire est partie prenante de la médecine moderne et future. Depuis plusieurs décennies [Fallais 1960], radiochimie et radiopharmacie intègrent les progrès des nouvelles technologies pour mettre à sa disposition des produits pharmaceutiques de hautes qualité et valeur ajoutée. Nous espérons que les résultats reportés ici pourront contribuer à la continuation de cette passionnante progression.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adam 1984 Adam M., Ruth T., Jivan S., Pate B. **The use of C-18 SEP PAK cartridges to simplify routine production of 2-deoxy-2- [¹⁸F]fluoro-D-glucose.** Int J Appl Radiat Isot 1984;35: 985-986.
- Ametamay 2008 Ametamey S., Honer M., Schubiger P. **Molecular imaging with PET.** Chem Rev 2008, 108: 1501-1516
- Bergström 2003 Bergström M., Grahnén A., Långström B. **Positron emission tomography microdosing: a new concept with application in tracer and early clinical drug development.** Eur J Clin Pharmacol 2003;59: 357-366.
- Cai 2007 Cai W., Chen X. **Nanoplatfoms for targeted molecular imaging in living subjects.** Small 2007;3: 1840-1854.
- Casella 1980 Casella V., Ido T., Wolf A., Fowler J. **Anhydrous F-18 labeled elemental fluorine for radiopharmaceutical preparation.** J Nucl Med 1980;21: 750-757.
- Couturier 2004 Couturier O., Luxen A., Chatal JF., Vuillez JP., Rigo P., Hustinx R. **Fluorinated tracers for imaging cancer with positron emission tomography.** Eur J Nucl Med Mol Imag 2004;31: 1182-1206.
- Dolbier 2005 Dolbier W. **Fluorine chemistry at the millenium.** J Fluor Chem 2005;126: 157-163.
- Erickson 2004 Erickson D., Li D., **Integrated microfluidic devices.** Anal Chim Acta 2004;507: 11-26.
- EU 2002 European Union's FP6, **Nanotechnologies and Nanosciences, knowledge-based multifunctional materials and new production and devices.** http://ec.europa.eu/research/fp6/index_en.cfm STRP 516984, **Lab-on-a-chip implementation of production processes for new molecular imaging agents.**
- Eudr(alex) 2003 Commission Européenn, **Good manufacturing practice (GMP) Guidelines.** Eudralex Volume 4, 2003/94/EC
http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/vol4_en.htm
(a) Annexe 1 Manufacture of Sterile Medicinal Products
(b) Annexe 3 Manufacture of RadioPharmaceuticals
- Fallais 1960 Fallais C. **Le radiopharmacien est-il né ?** 1960, mémoire de fin d'études de pharmacien, communication personnelle.
- Firestone 1996 Firestone B. **Table of isotopes.** Edité par Shirley V. chez John Wiley & Sons, 1996;Vol. I, ISBN 0-471-14918-7.
- Füchtner 1996 Füchtner F, Steinback J., Mäding P., Johannsen B. **Basic hydrolysis of 2[¹⁸F]fluoro-1,3,4,6-tetra-O-acetylD-glucose in the preparation of 2[¹⁸F]fluoro-2-deoxy-D-glucose.** Appl radiat Isot 1996;47: 61-66.
- Hahnemann 1810 Hahnemann S., **Organon de la médecine rationnelle d'après les lois homéopathiques.** Dresden, 1810.
- Hamacher 1986 Hamacher K., Coenen H., Stöcklin G. **Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxy-D-glucose using aminopolyether supported nucleophilic substitution.** J Nucl Med 1986;27: 235-238

- Ido 1977 Ido T., Wan CN., Fowler J., Wolf A. **Fluorination with F₂. A convenient synthesis of 2-deoxy-2-fluoro-glucose.** J Org Chem 1977;13: 2341-2342.
- Ido 1978 Ido T., Wan CN., Casella V., Fowler J., Wolf A. **Labeled 2-deoxy-D-glucose analogs. ¹⁸F-labeled 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose, 2-deoxy-2-fluoro-D-mannose and ¹⁴C 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose.** J Labeled Compd radiopharm 1978;14 175-183.
- Klingensmith 1945 Klingensmith CW. **The natural occurrence of fluoroacetic acid, the acid of the new rodenticide 1080.** Science 1945;102: 622-623.
- Lemaire 2002 Lemaire C., Damhaut P., Lauricella B., Mosdzianowski C., Morelle JL., Monclus M., Van Naemen J., Mulleneers E., Aerts J., Plenevaux A., Brihaye C., Luxen A. **Fast [¹⁸F]FDG synthesis by alkaline hydrolysis on a low polarity solid phase support.** J Label Compd Radiopharm 2002;45: 435-447.
- Le Bars 1998 Le Bars D., Lemaire C., Ginovart N., Plenevaux A., Aerts J., Brihaye C., Hassoun W., Leviel V., Mekhsian P., Weissmann D., Pujol JF., Luxen A., Comar D. **High-yield radiosynthesis and preliminary in vivo evaluation of p-[¹⁸F]MPPF, a fluoro analog of WAY-100635.** Nucl Med & biol 1998 ;25 :343-350.
- Lee 2005 Lee C., Sui G., Elizarov A., Shu C., Shin Y., Dooley A., Huang J., Daridon A., Wyatt P., Stout D., Kolb H., Witte O., Satyamurthy N., Heath J., Phelps M., Quake S., Tseng H. **Multistep synthesis of a radiolabeled imaging probe using integrated microfluidics.** Science 2005; 310: 1793-1796.
- Levin 2005 Levin C. **Primer on molecular imaging technology.** Eur J Nucl Med Mol Imaging 2005, 32: S325-S345
- Maecke 2005 Maecke H., Hofmann M., Haberkorn U., **⁶⁸Ga-labeled peptides in tumor imaging.** J Nucl Med 2005;46: 172S-178S.
- Marik 2006 Marik J., Sutcliffe J. **Click for PET: rapid preparation of [¹⁸F]fluoropeptides using CuI catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition.** Tetrahedron Letters 2006;47: 6681-6684.
- MB (19)60 Moniteur belge, **Arrêté royal relatif à la fabrication des médicaments.** 6 juin 1960, publication du 22/06/1960.
- MB (19)93 Moniteur belge, **Arrêté royal relatif à la protection des animaux d'expérience.** 14 novembre 1993, publication du 5/01/1994.
- MB 2001 Moniteur belge, **Arrêté royal portant règlement général de la protection de la population, des travailleurs et de l'environnement contre le danger des rayonnements ionisants.** 20 juillet 2001, publication du 31/08/2001.
- MB (20)06a Moniteur belge, **Arrêté royal relatif aux médicaments à usage humain et vétérinaire,** 14 décembre 2006, publication du 22/12/2006.
- MB (20)06b Moniteur belge, **Arrêté royal relatif à l'expérimentation sur la personne humaine.** 18 mai 2006, publication du 26/05/2006.
- Moses 2007 Moses J., Moorhouse A., **The growing applications of click chemistry.** Chem Soc Rev 2007;36: 1249-1262.
- Müller 2007 Müller K., Faeh C., Diederich F. **Fluorine in pharmaceuticals: looking beyond intuition.** Science 2007;317: 1881-1886.
- Nutt 2007 Nutt R., Vento L., Ridinger M. **In vivo molecular imaging biomarkers: clinical pharmacology's new "PET"?** 2007;81: 792-795.

- Ohtsuki 2004 Ohtsuki S. ***New aspects of the Blood-Brain Barrier transporters ; its physiological roles in the central nervous system.*** Biol Pharm Bull 2004;27: 1489-1496.
- Ong 2008 Ong S-E., Zhang S., Du H., Fu Y., ***Fundamental principles and applications of microfluidic systems.*** Frontiers in Bioscience 2008;13: 2757-2773.
- Padgett 1989 Padgett H., Schmidt D., Luxen A., Bida G., Satyamurthy N., Barrio J. ***Computer-controlled radiochemical synthesis: a chemistry process control unit for the automated production of radiochemicals.*** Applied Radiation and Isotopes 1989;40: 433-45.
- Patani 1996 Patani G., LaVoie J. ***Bioisosterism: a rational approach in drug design.*** Chem Rev 1996;96: 3147-3176.
- Randi 2001 Randy J., ***James Randi explains homeopathy***, conférence à l'Université de Princeton NJ, 2001
<http://stargoss.co.uk/badhomeopathy/modules/news/article.php?storyid=16>
- Schlyer 1987 Schlyer D., Bastos M., Wolf A. ***A rapid quantitative separation of fluorine-18 fluoride from oxygen-18 water.*** J Nucl Med 1987;28: 764 (poster 34th annual meeting, N°820)
- Sikora 2007 Sikora K. ***Personalized medicine for cancer: from molecular signature to therapeutic choice.*** Advances in cancer research 2007;96: 345-369.
- Smart 2001 Smart B. ***Fluorine substituent effects (on bioactivity).*** J Fluor Chem 2001;109: 3-11
- Tamayo 2007 Tamayo F., Turiel E., Martin-Esteban A. ***Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: recent developments and future trends.*** J Chrom A 2007;1152: 32-40.
- Tewson 1989 Tewson T. ***Procedures, pitfalls and solutions in the production of [¹⁸F]2-deoxy-2-fluoro-D-glucose: a paradigm in the routine synthesis of fluorine-18 radiopharmaceuticals.*** Nucl Med Biol 1989;16: 533-551.
- Ubeda 2006 Ubeda M., Dembinski R., ***Fluorous compounds and their role in separation chemistry.*** J Chem Educ 2006;83: 84-92.
- Wuest 2008 Wuest F., Berndt M., Bergmann R., van den Hoff J., Pietzsch J. ***Synthesis and application of [¹⁸F]FDG-maleimidehexyloxime ([¹⁸F]FDG-MHO): a [¹⁸F]FDG-based prosthetic group for the chemoselective ¹⁸F-labeling of peptides and proteins.*** Bioconjugate Chem, published on Web 05/16/2008.
- Yoshida 2002 Yoshida J-I., Itami K., ***Tag strategy for the separation and recovery.*** Chem Rev 2002;102: 3693-3716.

SECTION I

Métabolisme de la 2-[¹⁸F]fluoro-L-tyrosine

Pour vous orienter dans cette partie:

ASPECTS THEORIQUES		page
I.1	Introduction	26
I.2	Les acides α-aminés traceurs TEP	27
I.3	But du travail dans la section I	36

RESULTATS & DISCUSSION		page
I.4	Choix du modèle animal, administration, prélèvements et mesures	37
I.5	Biodistribution	39
I.6	Métabolisme	40
I.7	Fonction d'entrée	44
I.8	Discussion	45
I.9	Conclusions de la section I	47

PROTOCOLES EXPERIMENTAUX	page 48
---------------------------------	---------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	page 50
------------------------------------	---------

ASPECTS THEORIQUES

I.1 Introduction

Les protéines constituent une classe de molécules particulièrement importante pour la cellule. Quantitativement, elles représentent plus de la moitié de sa masse sèche. Qualitativement, leur diversité permet aux protéines d'exercer des fonctions très variées et essentielles à l'organisation et au fonctionnement cellulaire: structure de la cellule, processus enzymatiques, reconnaissance moléculaire, transport transmembranaire... Elles constituent en fait les outils par lesquels les cellules expriment leur information génétique et mettent en oeuvre les phénomènes biochimiques fondamentaux.

Par le passé, la synthèse des protéines dans les cellules cérébrales était considérée comme un phénomène très lent, voire inexistant. Cette conclusion était appuyée par plusieurs faits: le cerveau est le site de l'information permanente (mémoire), il ne dispose pas d'une capacité de régénération importante et il est délimité par la barrière hémato-encéphalique (BHE), limitant l'accès des molécules hydrophiles.

De nos jours, les mécanismes de transport actif des acides aminés à travers la BHE sont élucidés. En réalité, le métabolisme des protéines, hautement actif dans le cerveau, est impliqué dans des fonctions cruciales, comme la formation des neuropeptides par exemple. La plupart des protéines cérébrales sont dans un état dynamique. Globalement, leurs synthèse et dégradation se contrebalancent chez l'adulte dans un équilibre dynamique. Les protéines cérébrales sont caractérisées par des vitesses variables de renouvellement selon leur rôle. Les protéines dont la fonction est enzymatique nécessitent une dégradation plus rapide (régulation) que celle des éléments de structure. En moyenne, l'équilibre de renouvellement s'établit à 0,6-0,7%/heure chez l'adulte, puis déclinerait lentement avec l'âge [Lajtha 1993].

Au même titre que la consommation de glucose, la vitesse de synthèse des protéines est un indicateur de l'activité et de la santé du tissu nerveux. Une mesure précise *in vivo* de la vitesse de synthèse des protéines cérébrales doit permettre l'estimation

des altérations locales lors de processus variés comme le développement, la régénération après traumatisme ou maladie, l'effet de médicaments ou d'hormones, les désordres dégénératifs, les lésions néoplasiques, l'apprentissage, le sommeil, ou la mémoire.

I.2 Les acides α -aminés traceurs TEP

Le précurseur biochimique direct d'une protéine est l'aminoacyl-tRNA, entité intracellulaire. Le marquage de cette entité doit se faire indirectement en utilisant un acide α -aminé marqué administré sous forme d'injectable radiopharmaceutique. Pour la TEP, le traceur utilisé est donc une forme marquée au carbone-11 d'une entité normalement circulante ou un analogue dans le cas d'un marquage au fluor-18. Dans l'introduction générale, nous avons déjà expliqué l'orientation du CRC vers les traceurs marqués au fluor-18.

Dans le cadre de l'étude cinétique de la vitesse de synthèse des protéines cérébrales, les étapes pharmacocinétiques importantes sont le passage de la BHE et l'acceptation par un tRNA, à l'intervention d'une amino-acyl tRNA synthétase. Certains acides α -aminés fluorés ne sont pas capables de passer la barrière en utilisant les transporteurs membranaires naturels. D'autres passent effectivement la BHE, mais ne sont pas majoritairement incorporés dans les protéines. Par ailleurs, certaines molécules présentent un métabolisme périphérique ou cérébral important conduisant à l'apparition de métabolites compliquant les modèles mathématiques d'interprétation des mesures TEP ou dont la toxicité limite l'utilisation du traceur.

Dans le cas des acides α -aminés aromatiques, les principaux enzymes intervenant dans ces métabolisations sont la phénylalanine hydroxylase (PH), la tyrosine hydroxylase (TH), la décarboxylase des acides L-aminés aromatiques (AAAD), la cathécol-O-méthyl transférase (COMT) la monoamine oxidase (MAO) et la phénolsulfotranférase (PST). La figure I.1 reprend le schéma de métabolisation de la phénylalanine sous l'action de ces différents enzymes.

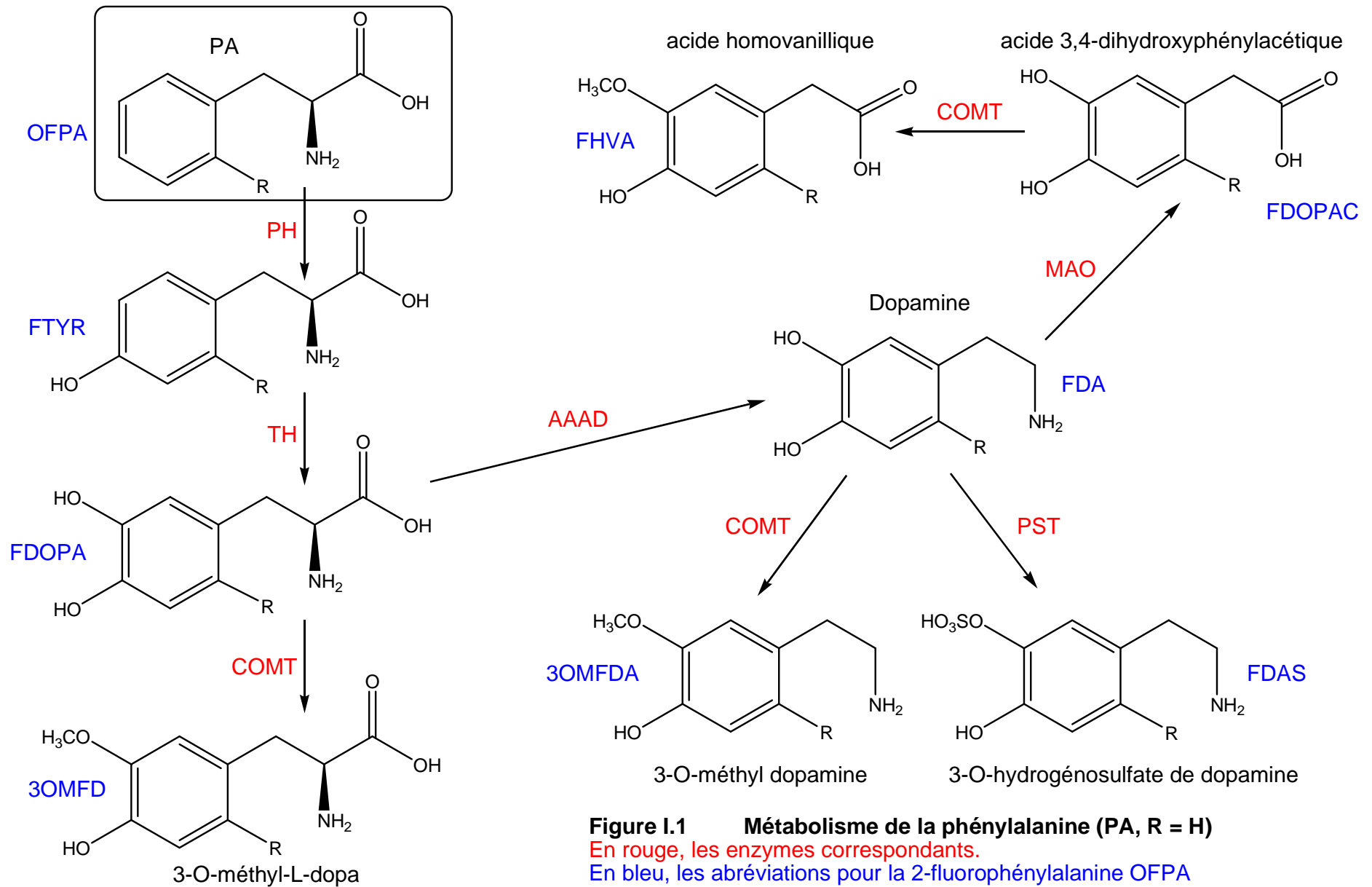
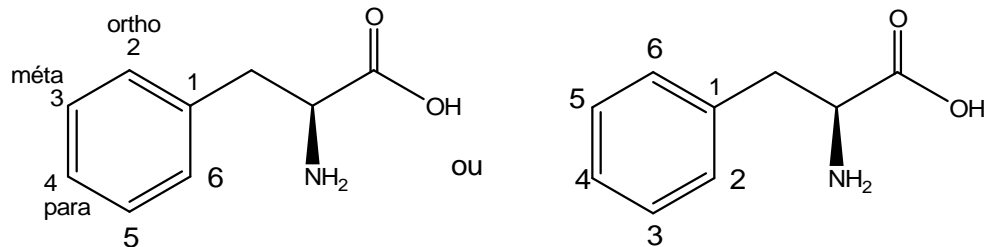


Figure I.1 Métabolisme de la phénylalanine (PA, R = H)
 En rouge, les enzymes correspondants.
 En bleu, les abréviations pour la 2-fluorophénylalanine OFPA
 et ses métabolites potentiels (R = F). [Melega 1990, Jager 2004]

Tableau I.2 (1^{ère} partie)

Dérivés fluorés de la phénylalanine testés
comme traceurs TEP

acide (S)-2-amino-3-phénylpropanoïque



Autre
substituant

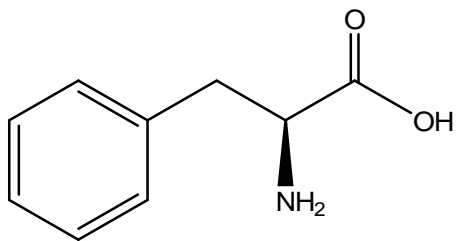
SUBSTITUANT EN POSITION 4

- H

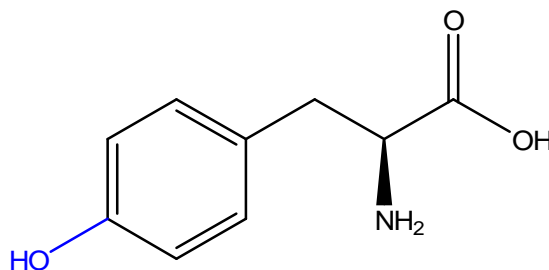
- OH

-F

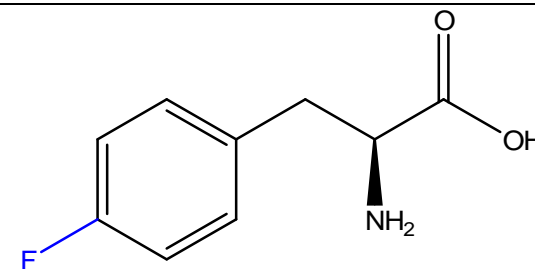
- H
en 2 et 3



L-Phénylalanine
(PHE)

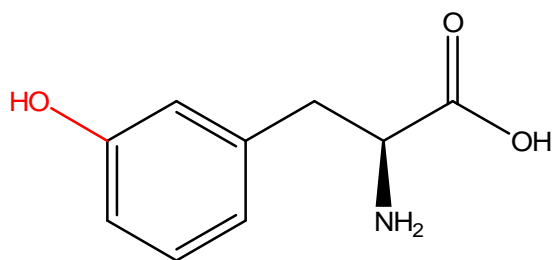


4-hydroxy-L-phénylalanine
(L-tyrosine, TYR)

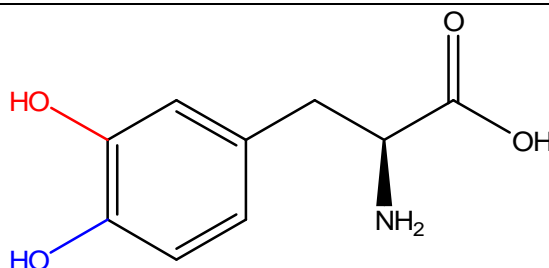


4-fluoro-L-phénylalanine
(PFPA)

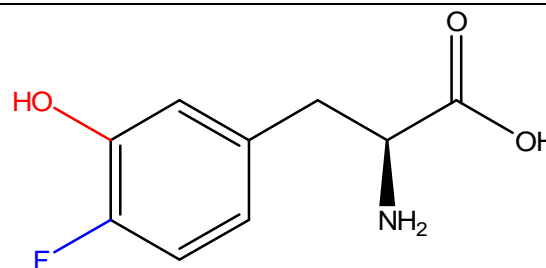
- OH en 3



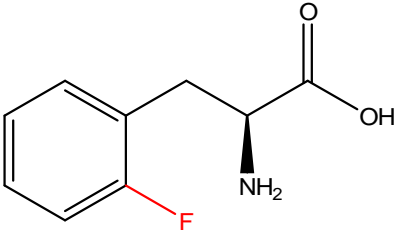
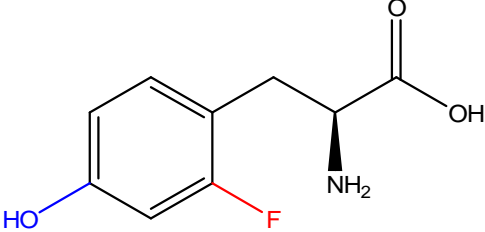
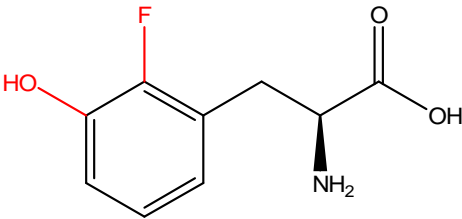
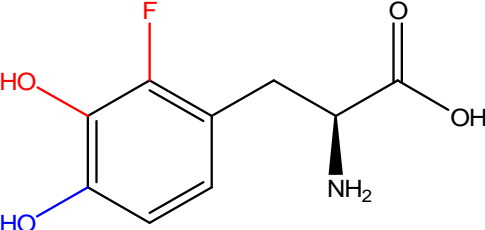
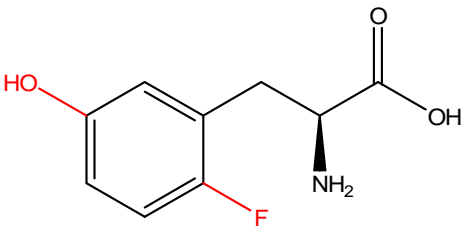
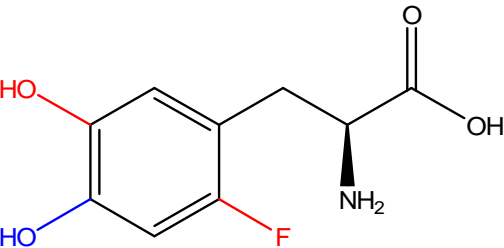
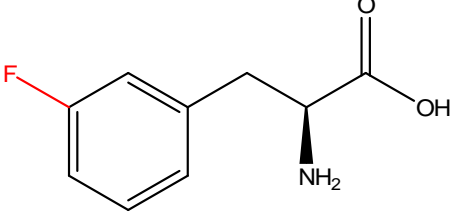
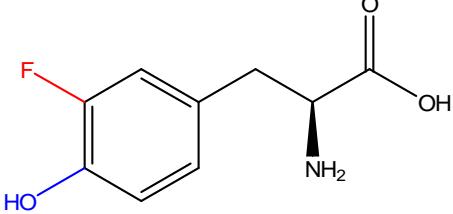
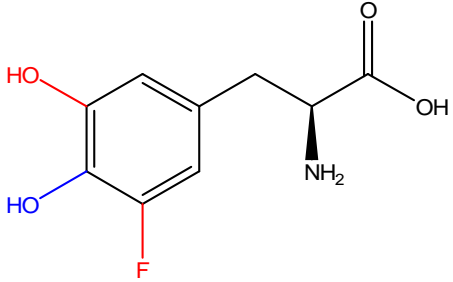
3-hydroxy-L-phénylalanine
(L-*m*-tyrosine, MT)



3,4-dihydroxy-L-phénylalanine
(Dopa)



4-fluoro-5-hydroxy-L-phénylalanine
(4-FMT)

Tableau 1.2 (2 ^{ème} partie)	SUBSTITUANT EN POSITION 4	
	- H	- OH
- F en 2	 <p>2-fluoro-L-phénylalanine (<i>o</i>-fluoro-L-phénylalanine, OFPA)</p>	 <p>2-fluoro-4-hydroxy-L-phénylalanine (<i>o</i>-fluoro-L-tyrosine, OFT, FTYR)</p>
- F en 2 et - OH en 3	 <p>2-fluoro-3-hydroxy-L-phénylalanine (2-FMT)</p>	 <p>2-fluoro-3,4-dihydroxy-L-phénylalanine (2-FDOPA)</p>
- F en 2 et - OH en 5	 <p>2-fluoro-5-hydroxy-L-phénylalanine (6-FMT)</p>	 <p>2-fluoro-4,5-dihydroxy-L-phénylalanine (6-FDOPA)</p>
- F en 3	 <p>3-fluoro-L-phénylalanine (<i>m</i>-fluoro-L-phénylalanine, MFPA)</p>	 <p>3-fluoro-4-hydroxy-L-phénylalanine (<i>m</i>-fluoro-L-tyrosine, MFT)</p>
- F en 3 - OH en 5		 <p>3-fluoro-4,5-dihydroxy-L-phénylalanine (5-FDOPA)</p>

De nombreux analogues de la phénylalanine, de la tyrosine, de la *m*-tyrosine et de la Dopa, fluorés sur le noyau aromatique, ont été testés comme marqueurs de différents processus [Coenen 1993]. Les structures de base non fluorées sont représentées dans le tableau I.2 (colonnes 1 et 2, 1^{ère} partie). En plaçant le marqueur en position 4, on obtient la 4-fluoro-L-phénylalanine (PFPA) et la 4-fluoro-L-*m*-tyrosine (4-FMT) (colonne 3, 1^{ère} partie).

Dans la deuxième partie du tableau, on peut voir les molécules obtenues en substituant les structures de base sur les positions 2 ou 3 avec un fluor, en ajoutant parfois une fonction phénol en position 5 : 2-fluoro-L-phénylalanine (OFPA), 2-fluoro-L-tyrosine (FTYR), 2-fluoro-L-*m*-tyrosine (2-FMT), 2-fluoro-3,4-dihydroxy-L-phénylalanine (2-FDOPA), 2-fluoro-5-hydroxy-L-phénylalanine (6-FMT), 2-fluoro-4,5-dihydroxy-L-phénylalanine (6-FDOPA), 3-fluoro-L-phénylalanine (MFPA), 3-fluoro-4-hydroxy-L-phénylalanine (MFT), 3-fluoro-4,5-dihydroxy-L-phénylalanine (5-FDOPA).

Les acides α -aminés aromatiques fluorés passent les membranes cellulaires par l'intervention du système de transport L [Laverman 2002]. La plupart de ces molécules ne sont pas incorporées dans les protéines, mais certaines sont utilisées en TEP comme traceur de ce transport transmembranaire.

Les analogues fluorés de la Dopa sont rapidement décarboxylés (5-FDOPA, 6-FDOPA) en analogue fluoré de la dopamine ou soumis à l'action de la COMT (2-FDOPA, 5-FDOPA, 6-FDOPA), donnant lieu à l'apparition de dérivé méthylé. La méthylation de ces dérivés fluorés est plus importante que celle de la Dopa elle-même, mais elle s'exerce dans une moindre proportion pour la 6-FDOPA par rapport aux deux autres dérivés. Cet avantage explique que seule la 6-[¹⁸F]FDOPA soit utilisée en pratique [Coenen 1993]. La méthylation est la voie périphérique préférentielle. Au niveau cérébral, la décarboxylation est prépondérante. Ce traceur reflète donc le métabolisme de la Dopa et sert à l'évaluation de l'activité biochimique dopaminergique présynaptique [Melega 1990]. On l'envisage également pour l'imagerie tumorale [Couturier 2004, Jager 2004].

Les dérivés de la *m*-tyrosine (2-FMT, 4-FMT, 6-FMT) ont été étudiés dans le but d'obtenir un traceur dopaminergique au métabolisme simplifié. Ces molécules, sans structure

catéchol, ne subissent en effet pas l'action de la COMT, mais conservent leur caractère de substrat pour la AAAD [Dejesus 1997, Melega 1989].

Les dérivés pour lesquels le fluor est en position 3 (MFPA, MFT) conduisent, lors de leur métabolisation, à l'apparition d'acide fluoroacétique toxique. Ils ne sont pas utilisés [Coenen 1993].

Traceurs potentiels de la synthèse des protéines

Les acides α -aminés fluorés suivants sont incorporés dans les protéines.

1) la 4-fluoro-L-phénylalanine (PFPA) et la 2-fluoro-L-phénylalanine (OFPA)

La PFPA est incorporée dans les protéines cérébrales. Néanmoins, cette incorporation est lente (60% de l'activité tissulaire après 2 heures) et une proportion non négligeable de l'activité (15%) est transformée en métabolites cérébraux non identifiés. L'incorporation de l'OFPA est encore plus faible que celle de la PFPA [Coenen 1993]. En outre, l'hydroxylation de la PFPA en position 4 conduit à un relargage de [^{18}F]fluorure [Bodsh 1988].

2) la 2-fluoro-L-tyrosine (FTYR)

Le métabolisme cérébral de la [^{18}F]FTYR, obtenue avec une faible activité spécifique par la voie de synthèse électrophile, a été étudié chez la souris [Coenen 1989]. L'acceptation par l'aminoacyl-tRNA synthétase et son incorporation générale dans une large gamme de protéines ont été démontrées par électrophorèse sur gel. L'incorporation dans les protéines cérébrales est rapide et pratiquement quantitative après 60 minutes. Une faible proportion de métabolite polaire (jusqu'à 1,5% de l'activité totale dans le tissu) a été mise en évidence dans le cortex à 40 minutes après injection. Cette proportion augmente à 4,2% dans le striatum. L'identité potentielle de ce métabolite (6-[^{18}F]FDOPA) n'a pas été confirmée.

La synthèse des acides aminés aromatiques marqués au fluor-18 fait l'objet de recherches soutenues au CRC [Lemaire 1994, Lemaire 2001, Lemaire 2004]. La 2-[^{18}F]fluoro-L-tyrosine de haute activité spécifique est donc disponible avec d'appréciables activités EOS (fig. I.3). Une collaboration avec le CHU liégeois a conduit à son évaluation pour l'imagerie oncologique [Hustinx 2003, Rutten 2007, Lovinfosse 2008].

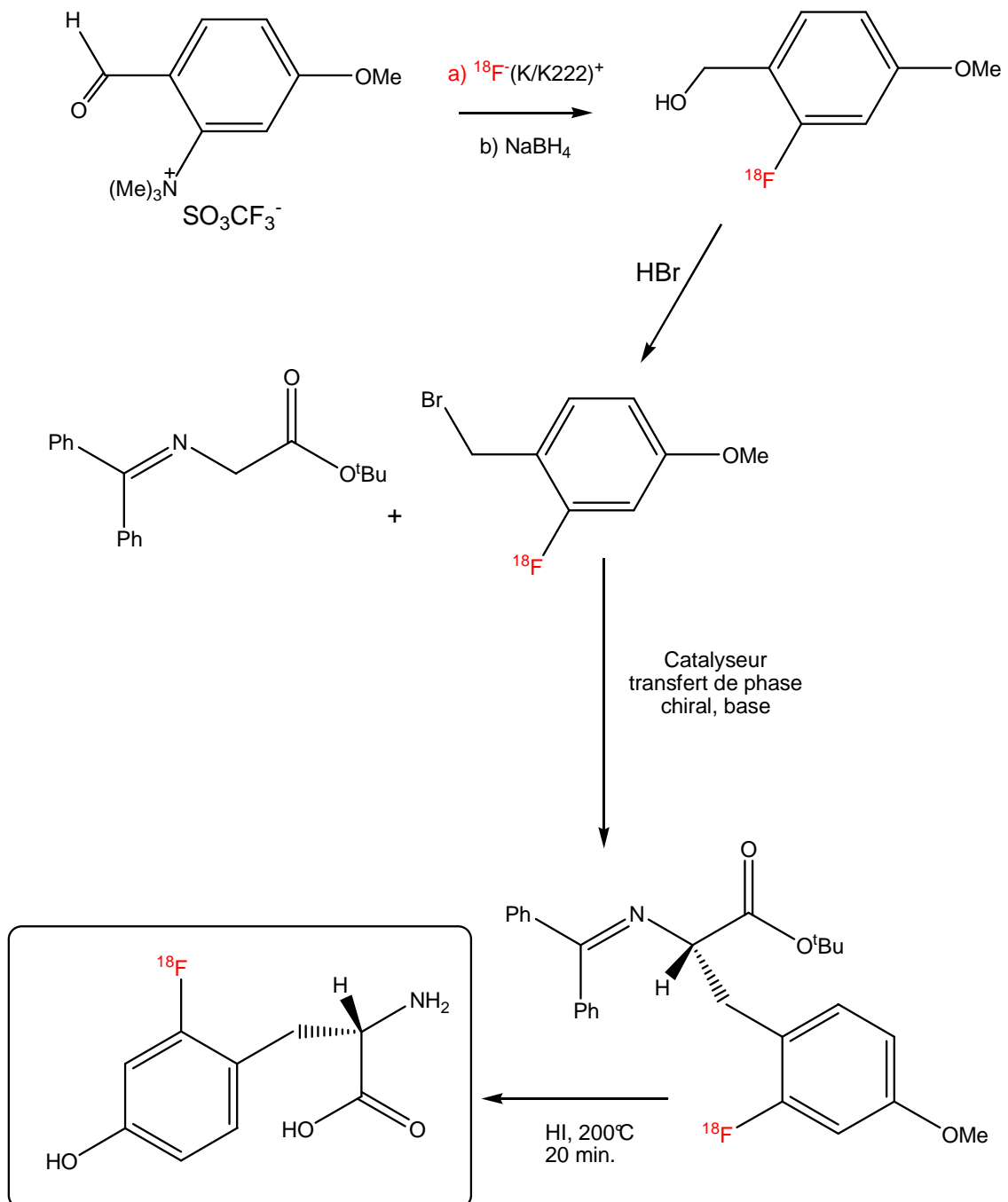


Figure I.3 Radiosynthèse actuellement utilisée au CRC pour la [^{18}F]FTYR [Lemaire 2001]

La haute activité spécifique du traceur utilisé dans ce travail pourrait ne pas avoir de conséquences physiologiques significatives étant donné que la concentration plasmatique des acides aminés en compétition avec le traceur pour les systèmes biologiques (transporteur, enzymes) est nettement plus élevée. Toutefois, il n'est pas possible d'exclure *a priori* l'existence de mécanismes totalement spécifiques pour l'analogue fluoré et dans lesquels les acides aminés naturels non fluorés ne seraient pas impliqués du tout. L'utilisation d'un traceur de haute activité spécifique augmente la sensibilité de la détection de tels mécanismes potentiels.

3) la cis-4-[¹⁸F]fluoro-L-proline

Par ailleurs, l'incorporation protéique de la cis-4-[¹⁸F]fluoro-L-proline (fig. I.4), analogue de l'acide α -aminé naturel non aromatique, traceur de la synthèse du collagène, a été mise en évidence dans le rein et les tumeurs pancréatiques chez la souris [Wester 1999]. Cette incorporation est lente (70 %, 4 heures après injection). Cette incorporation n'a pas pu être confirmée chez l'homme pour des tumeurs de la sphère urologique [Langen 2001]. Son accumulation dans des gliomes humain est corroborée à une rupture de la barrière hématoencéphalique [Langen 2004], limitant son utilité neurologique non oncologique.

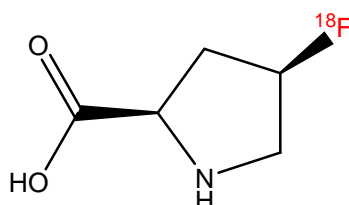
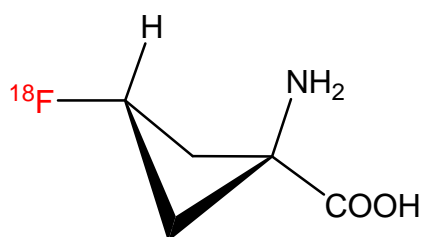


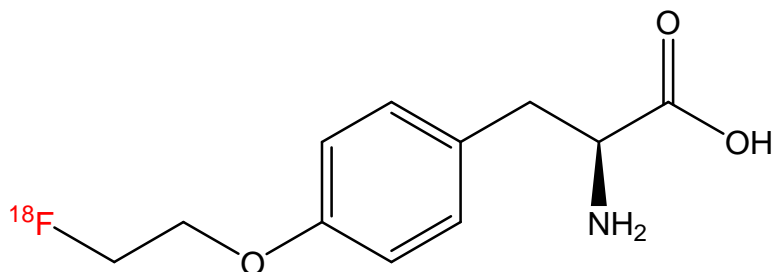
Figure I.4 Cis-4-[¹⁸F]fluoro-L-proline.

Autres acides aminés fluorés

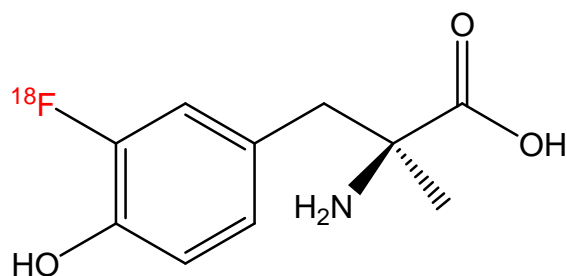
D'autres acides aminés fluorés, pour lesquels l'incorporation dans les protéines est absente ou très faible, ont également été envisagés comme traceurs du transport actif transmembranaire et donc testés pour leur intérêt en imagerie. Ce ne sont plus des dérivés de fluoration de molécules naturelles, mais des dérivés aromatiques comportant un squelette carboné plus sophistiqué ou des structures cycliques originales. Des exemples sont montrés dans la figure I.5.



Acide 1-amino-3-[^{18}F]fluorocyclobutane-1-carboxylique [Shoup 1999]



O-(2-[^{18}F]fluoroéthyl)-L-tyrosine [Langen 2006]



3-[^{18}F]fluoro-L- α -méthyltyrosine [Inoue 1998]

Figure I.5

Exemples d'autres acides α -aminés [^{18}F]fluorés.

I.3 But du travail dans la section I

Avec l'activité neuroendocrine, la synthèse des acides nucléiques et la transcription des gènes, la synthèse des protéines est décrite comme l'un des mécanismes potentiels à la base de la plasticité synaptique cérébrale [Dand-Vu 2006]. Donc, malgré l'intérêt évident des acides aminés en imagerie tumorale et le fait que l'incorporation ne soit pas absolument obligatoire pour cette application, les acides aminés marqués incorporés présentent l'avantage de cibler des phénomènes non tumoraux importants. A côté de l'utilité en oncologie, imager la synthèse des protéines présente donc un réel intérêt en termes de connaissances fondamentales, aussi bien que pour les applications potentielles dans des pathologies en relation avec des phénomènes neurologiques. Dans l'état actuel des connaissances, étant donné son incorporation rapide, qualitativement générale et quantitativement majoritaire, la [¹⁸F]FTYR est le traceur le plus prometteur pour la mesure de la vitesse de synthèse des protéines cérébrales *in vivo* par tomographie à émission de positon. Son métabolisme, étudié chez la souris, avec une faible activité injectée d'un traceur de basse activité spécifique, semble très limité. L'entrée du traceur dans la voie de métabolisation de la 6-FDOPA est conditionnée par son rôle potentiel comme substrat pour la tyrosine hydroxylase, qui transformerait la [¹⁸F]FTYR en 6-[¹⁸F]FDOPA (fig. I.1 , R=F, TH).

Le but de cette partie du travail sera d'étudier le métabolisme cérébral de la 2-[¹⁸F]fluoro-L-tyrosine avec un traceur de haute activité spécifique. En particulier, l'incorporation de la 2-[¹⁸F]fluoro-L-tyrosine dans les protéines sera étudiée et son entrée dans la voie de métabolisation de la 6-FDOPA sera envisagée par l'étude des métabolites non protéiques plasmatiques et tissulaires.

RESULTATS & DISCUSSION**I.4 CHOIX DU MODELE ANIMAL, ADMINISTRATION , PRELEVEMENTS ET MESURES**

L'immobilisation physique ou chimique altère de nombreux paramètres physiologiques cérébraux (flux sanguin, métabolisme du glucose, synthèse des protéines) [Lestage 1985]. En particulier, des modifications cérébrales régionales de la vitesse de synthèse des protéines ont pu être observées chez le rat lors de l'usage de certains anesthésiques [Smith 1998]. Ce problème de modifications des paramètres physiologiques est d'ailleurs relevé comme une difficulté inhérente à la réalisation des études TEP chez le petit animal, étant donné que celles-ci nécessitent l'immobilisation. Par exemple, la captation striatale de la 6-[¹⁸F]fluoro-L-*m*-tyrosine est trois fois plus importante chez la souris anesthésiée que chez l'animal non anesthésié [Ametamay 2008].

Afin de limiter les effets de l'anesthésie, de la chirurgie et de l'immobilisation lors des études métaboliques, le choix du modèle animal s'est porté vers le rat vigil cathétérisé, décrit par l'équipe du Professeur BOBILLIER [Lestage 1985]. Une double pose de cathéters, artérielle et veineuse, est pratiquée sur l'aorte abdominale et la veine cave avec émergence dans la nuque de l'animal (figure I.6). La procédure de pose des cathéters est décrite dans le protocole PI.1. Nous avons pu la mettre en application au CRC après une formation pratique réalisée dans le laboratoire du Professeur BOBILLIER (Laboratoire de Neuropharmacologie Moléculaire, UCB-CNRS UMR 5542, Faculté de Médecine Laënnec, Lyon, France).



Figure I.6 Emergence des cathéters dans la nuque du rat .
L'extrémité est refermée par chauffage en attente d'une connexion ultérieure.

Dans cette configuration, l'animal peut être gardé en conditions physiologiques plusieurs semaines après chirurgie. Dans la pratique, un minimum de quatre jours a été observé entre la pose et l'utilisation de l'animal pour les études métaboliques. La plupart des individus ont été injectés avec le traceur dans un délai maximal d'une semaine, mais certains d'entre eux ont été conservés jusqu'à 4 semaines en animalerie avant utilisation.

La séquence d'administration et de prélèvement suivante a été suivie : vingt heures avant l'administration, l'animal est privé de nourriture. L'animal reste dans sa cage habituelle (individuelle après chirurgie). La connexion s'effectue en coupant le bout soudé de la ligne artérielle et en utilisant un morceau de tube en silicone permettant de la rallonger par un tube en polyéthylène vers une pièce métallique qui autorise un mouvement libre de l'animal (rotation sur 360°). L'injection du traceur s'effectue en coupant le bout soudé de la ligne veineuse et en y connectant directement l'aiguille de la seringue dans laquelle la solution de traceur a été prélevée. L'injection s'effectue en bolus (environ 15 secondes), la ligne est rincée avec du liquide physiologique, puis l'aiguille est obturée. La ligne artérielle est utilisée pour prélever les échantillons sanguins goutte à goutte pendant les premières minutes pour obtenir le profil sanguin d'injection. Ensuite, des prélèvements sont effectués à intervalles réguliers, avec chaque fois un rinçage de la ligne avec du liquide physiologique pour éviter les coagulations et assurer l'homogénéité de l'échantillon suivant. Les tubes de récupération sont préalablement héparinés.

A la fin de l'expérience, l'animal est décapité et disséqué. On prélève le cerveau et des parties des principaux organes. Un échantillon de sang est également récupéré au temps final. Le cerveau est coupé en deux longitudinalement. On mesure l'activité d'une moitié, l'autre est disséquée directement sur une plaque refroidie à 0°C pour obtenir cortex, striatum et cervelet. Des échantillons pesés de chaque tissu sont utilisés pour l'étude des métabolites. L'autre moitié est ensuite disséquée de la même manière et chaque tissu est soumis à son tour à une mesure de radioactivité. Des échantillons pesés des principaux organes sont également comptés. Le sang récupéré au temps final est centrifugé pour obtenir le plasma dont on détermine la radioactivité sur une fraction pesée. Une autre fraction est soumise à un traitement par une solution d'acide trichloroacétique, puis à une centrifugation qui sépare un culot et un surnageant. On transfère ce dernier dans un

nouveau tube. Une fraction du surnageant est prélevée pour comptage et une autre pour l'injection en CLHP. La radioactivité du culot isolé est également déterminée.

Les détails expérimentaux sont décrits dans le protocole PI.2. Les données reportées correspondent à l'administration en bolus de 20 à 325 MBq de [¹⁸F]FTYR de haute activité spécifique à 14 rats (230-410 g). Les temps intermédiaires de prélèvement sanguin étaient 15, 30, 45, 60 et/ou 90 minutes après injection. La durée totale de l'observation avant décapitation était 30 (n=2), 60 (n=5), 90 (n=3) ou 120 (n=4) minutes.

La majorité des données collectées sont présentées ici sous forme de graphiques. Les valeurs sont également disponibles sous forme de tables <http://www.biomedcentral.com/1756-6649/8/4>

I.5 BIODISTRIBUTION

La biodistribution après injection de la [¹⁸F]FTYR, exprimée par le pourcentage de l'activité injectée retrouvée par gramme de tissu (%IA/g), en fonction du temps, est présentée dans le tableau I.7.

% IA / g	Foie	Rein	Intestin	Cerveau	Muscle
30 min. (n=2)	1,24	0,64	0,64	0,16	0,14
60 min. (n=5)	1,17 ± 0,13	0,61 ± 0,08	0,85 ± 0,15	0,15 ± 0,02	0,15 ± 0,03
90 min. (n=3)	1,15 ± 0,11	0,54 ± 0,12	0,63 ± 0,12	0,14 ± 0,03	0,08 ± 0,06
120 min. (n=4)	1,00 ± 0,25	0,64 ± 0,06	0,90 ± 0,11	0,16 ± 0,03	0,15 ± 0,03
	Os	Coeur	Poumon	Testicule	Plasma
30 min. (n=2)	0,42	0,25	0,33	0,14	0,33 ± 0,04 (n=5)
60 min. (n=5)	0,78 ± 0,25	0,26 ± 0,02	0,37 ± 0,04	0,13 ± 0,01	0,55 ± 0,06 (n=7)
90 min. (n=3)	0,99 ± 0,13	0,28 ± 0,03	0,30 ± 0,12	0,13 ± 0,02	0,80 ± 0,27 (n=4)
120 min. (n=4)	1,12 ± 0,43	0,31 ± 0,05	0,47 ± 0,13	0,16 ± 0,04	0,85 ± 0,25 (n=3)

Tableau I.7 Biodistribution de la [¹⁸F]FTYR

Les données pour le plasma, le cerveau dans son ensemble et chaque tissu cérébral séparé sont présentées dans la figure I.8.

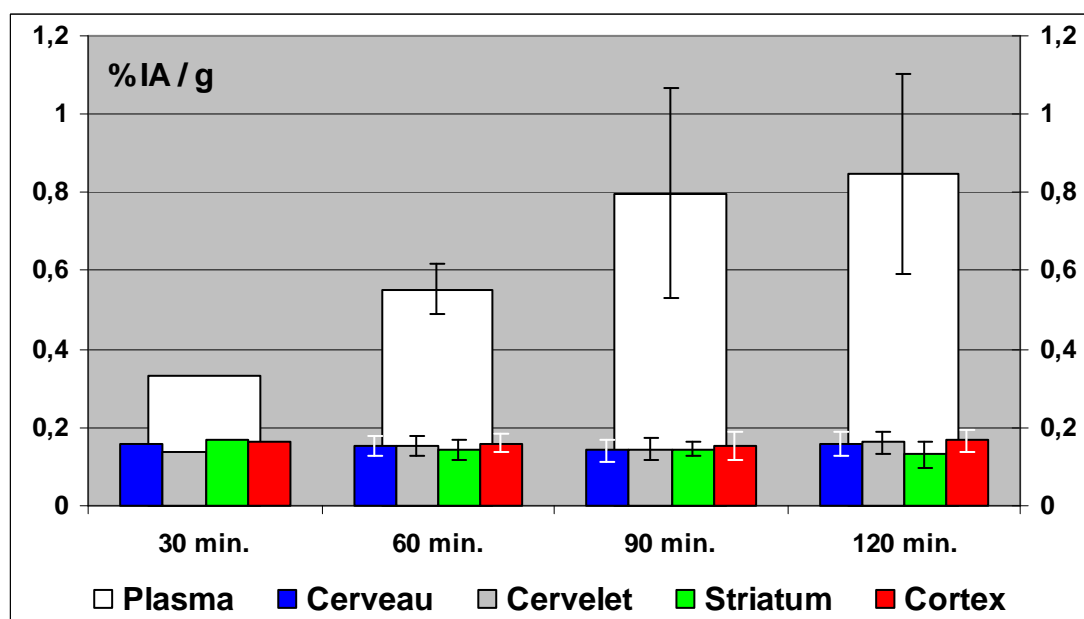


Figure I.8 Biosdistribution plasmatique et cérébrale de la [^{18}F]FTYR
Moyenne des pourcentages de l'activité injectée retrouvés par gramme en fonction du temps pour le plasma, le cerveau et les tissus cérébraux. Les barres d'erreur représentent la déviation standard. Pour le plasma et le cerveau, voir n dans le tab. I.7. Pour les tissus : n = 2 à 30 min. ; n = 3 à 5 pour les temps supérieurs.

I.6 METABOLISME

Pour chaque tissu cérébral (cervelet, striatum et cortex) et le plasma, la répartition des différentes formes radiochimiques a été étudiée par précipitation des protéines et par une analyse CLHP réalisée sur le surnageant. Le %IA/g retrouvé dans le culot a été calculé par la mesure de la radioactivité du culot pondérée par la masse de tissu ou plasma mise en œuvre. Le pourcentage de [^{18}F]FTYR inchangée dans les fractions collectées lors de l'analyse CLHP a été calculé par la mesure de la radioactivité de ces fractions rapportée à l'activité totale éluée. Ce pourcentage a ensuite été utilisé pour calculer le pourcentage de l'activité injectée retrouvée sous forme inchangée par gramme de tissu (en pondérant par la masse de tissu ou plasma mise en œuvre). La répartition des différentes espèces radioactives dans la radioactivité totale mesurée en fonction du temps est présentée dans la figure I.9 pour le plasma, dans la figure I.10 pour le cervelet, dans la figure I.11 pour le striatum et dans la figure I.12 pour le cortex.

Dans ces quatre figures, la radioactivité associée à la fraction précipitée est représentée en jaune (valeur en bas à l'intérieur du rectangle, la barre d'erreur inférieure représente la déviation standard). La radioactivité associée à la fraction inchangée est représentée en bleu (valeur à gauche, la barre d'erreur supérieure représente la déviation standard). En blanc, le reste du %IA/g représentant la fraction des métabolites non précipitée par l'acide trichloroacétique.

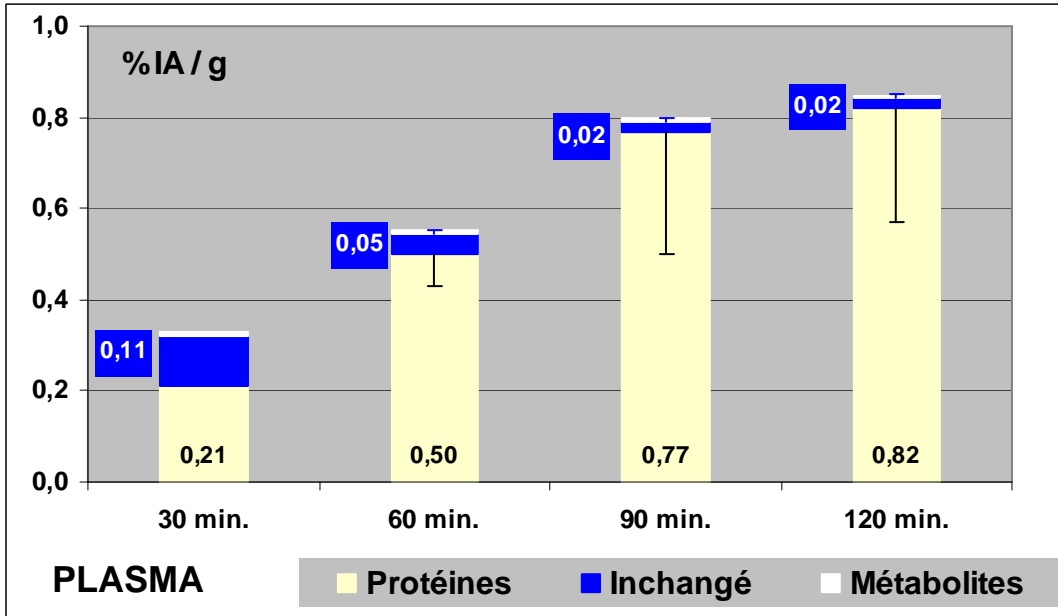


Figure I.9 Répartition de la radioactivité dans le %IA/g total - plasma

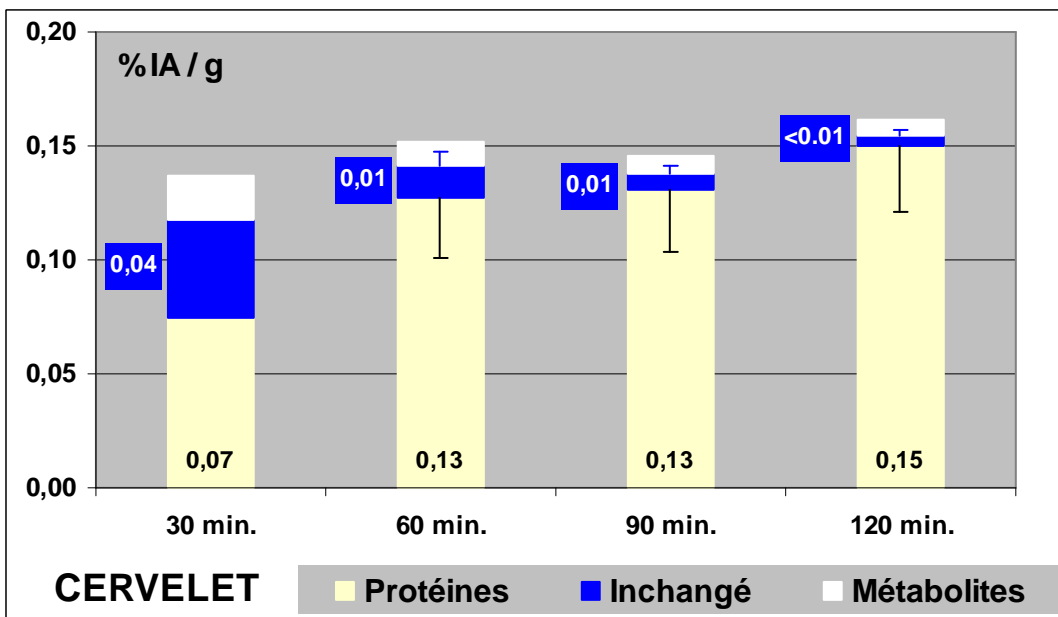


Figure I.10 Répartition de la radioactivité dans le %IA/g total - cervelet

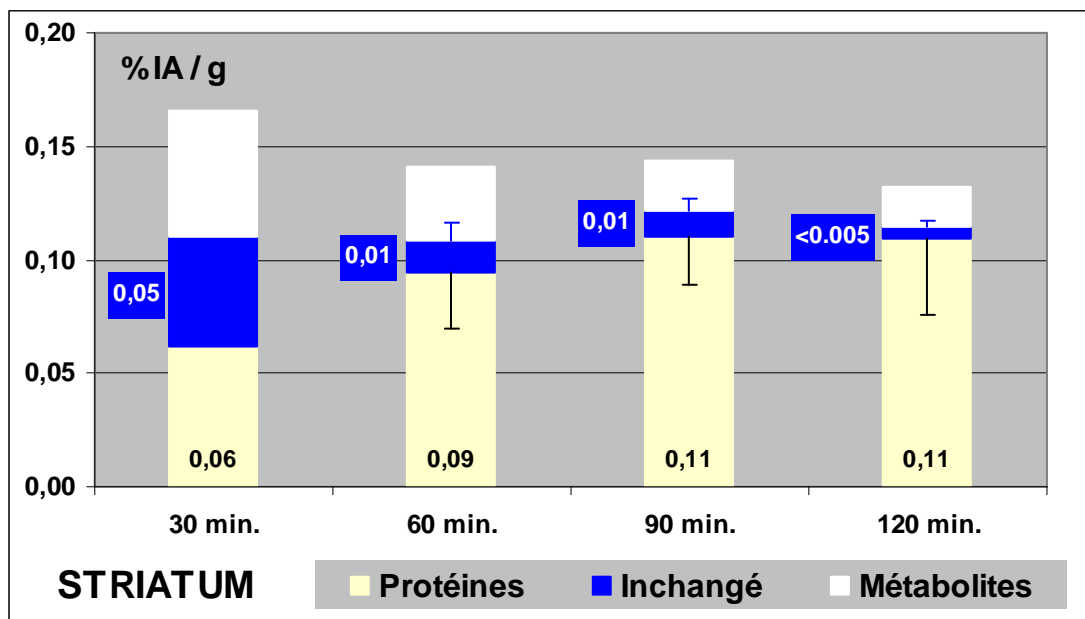


Figure I.11 Répartition de la radioactivité dans le %IA/g total - striatum

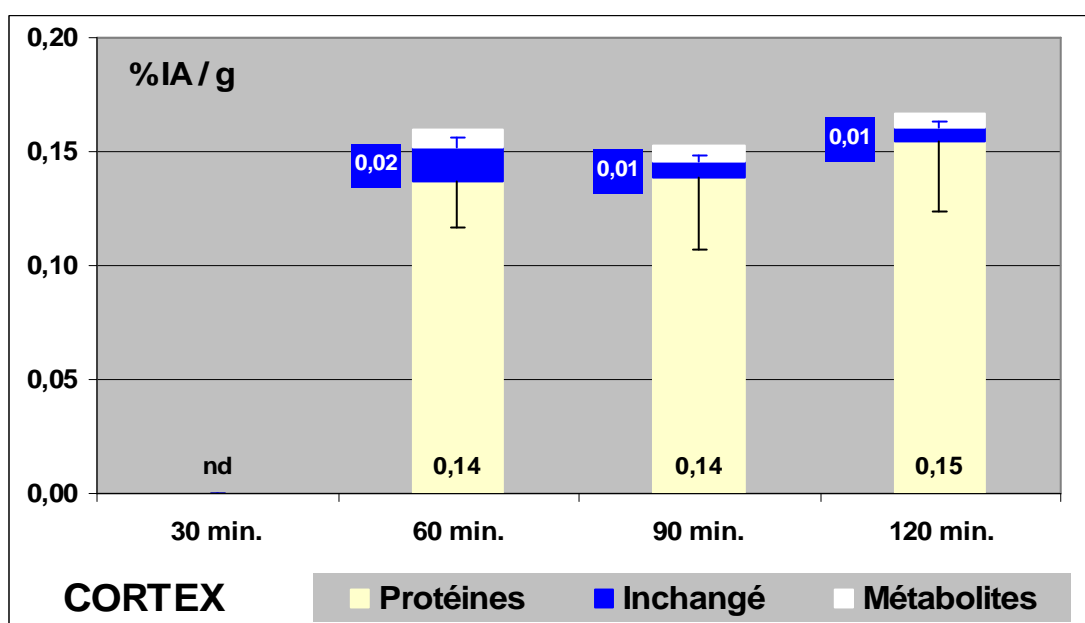


Figure I.12 Répartition de la radioactivité dans le %IA/g total – cortex
 nd : non déterminé

Des exemples de profils d'activité obtenus en CLHP pour les tissus cérébraux sont montrés dans les figures I.13 et I.14 (n=1, sans et avec gradient de débit).

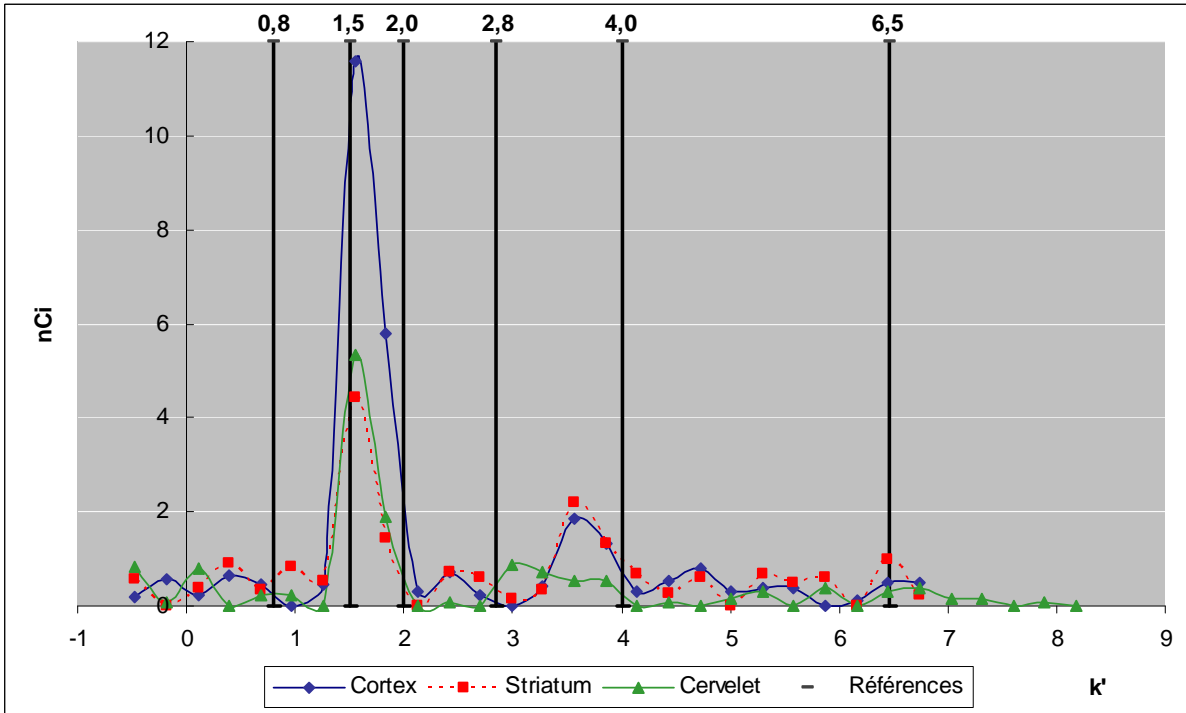


Figure I.13 Exemple de profils CLHP sans gradient de débit
 Activité injectée à l'animal : 8,8 mCi – temps final : 120 minutes.
 K' Réf. : FDOPA 0,8 ; FTYR 1,5 ; 3OMeFDOPAC 2,0 ; FDOPAC 2,8 ; FDA 4,0 ; FHVA 6,5

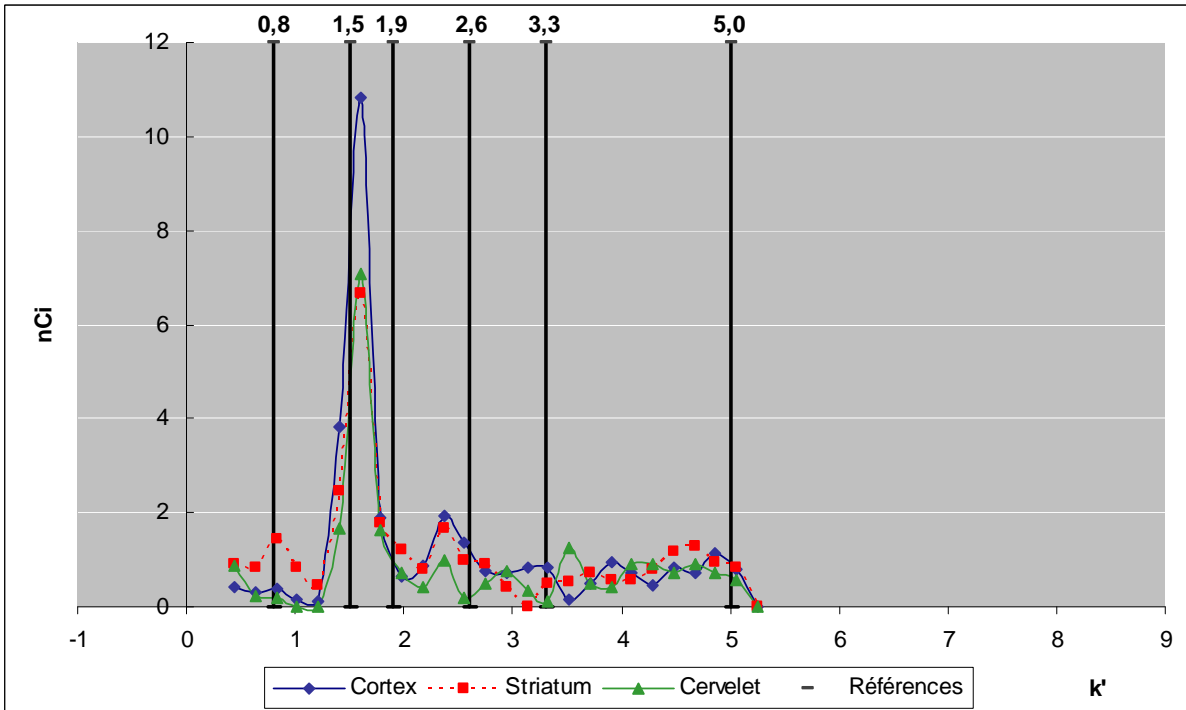


Figure I.14 Exemple de profils CLHP avec gradient de débit
 Activité injectée à l'animal : 3,3 mCi – temps final : 90 minutes.
 K' Réf. : FDOPA 0,8 ; FTYR 1,5 ; 3OMeFDOPAC 1,9 ; FDOPAC 2,6 ; FDA 3,3 ; FHVA 5,0

I.7 FONCTION D'ENTREE

Les valeurs moyennes des activités plasmatiques à partir de 15 minutes après l'injection ont été corrigées en tenant compte des proportions totales de métabolites (protéines et métabolites solubles dans le surnageant) pour obtenir la cinétique de l'activité plasmatique artérielle après injection de [^{18}F]FTYR de haute activité spécifique. Ces valeurs sont présentées à la figure I.15 aux côtés des valeurs observées dans les premières minutes pour l'activité plasmatique d'un animal en particulier.

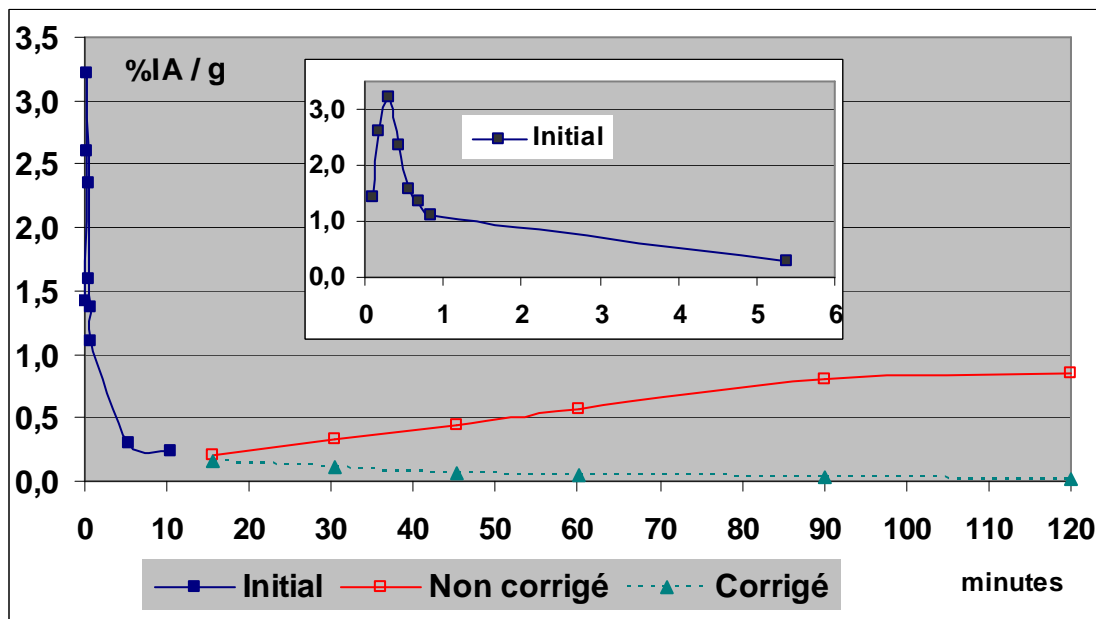


Figure I.15 Répartition de la radioactivité dans le %IA/g total - cortex
 Cinétique de l'activité plasmatique artérielle totale corrigée ou non pour l'apparition des métabolites totaux (précipités ou non par l'acide trichloroacétique). Les valeurs au-delà de 10 minutes sont des valeurs moyennes pour toutes les observations. Les valeurs pour des temps inférieurs à 15 minutes représentent une mesure de l'activité plasmatique totale chez un animal particulier.

I.8 DISCUSSION

L'analogue fluoré de la tyrosine passe rapidement la barrière hémato-encéphalique comme le démontre les données du cerveau pour lequel l'assimilation atteint déjà la valeur maximale observée 30 minutes seulement après injection (fig. I.8). La captation absolue dans le tissu cérébral est alors d'environ 0,15% de l'activité injectée par gramme de tissu. En raison des caractéristiques du rat (taille, poids et volume de distribution), cette valeur est plus faible que celle reportée pour la souris (~1,3%IA/g à 40 min.; ~2%IA/g à 60 min. [Coenen 1989]).

Par ailleurs, l'activité totale du plasma augmente avec le temps (Tabl. I.7), après le pic initial dû à l'injection, ce qui indique l'élimination de composés radioactifs par les tissus. La captation osseuse de radioactivité augmente aussi et ce d'une manière plus intense que les autres organes comme le muscle ou le cœur. Ceci révèle la probable libération de [^{18}F]F⁻ pendant le métabolisme du traceur. Dans les différentes régions du cerveau étudiées séparément, on observe une distribution homogène de la radioactivité.

Dans tous les tissus étudiés, la radioactivité associée à la fraction protéique augmente de 30 à 120 minutes après injection (fig. I.9-I.12). A 60 minutes, exprimée sous forme de pourcentage de l'activité totale dans le tissu, cette fraction dans le cervelet et le cortex de rat (respectivement 84% et 85%) correspond bien à la valeur reportée pour le cortex de souris (84%). Chez le rat, l'incorporation dans les régions non dopaminergiques atteint 90% de l'activité totale à 120 minutes. Par contre, l'incorporation observée est moindre dans le striatum (66% à 120 minutes) que dans les autres régions cérébrales. Toutefois, la confirmation statistique de cette tendance nécessiterait la réalisation d'un plus grand nombre d'observations. L'augmentation d'activité plasmatique observée à partir de 15 minutes après injection est majoritairement due à la contribution des protéines (fig. I.15).

Le pourcentage de [^{18}F]FTYR inchangée dans le surnageant après le traitement précipitant diminue dans le temps dans tous les tissus. Ceci indique que le traceur entre dans une autre voie métabolique que la simple incorporation dans les protéines. Ce pourcentage de traceur inchangé est moindre dans le striatum pour tous les temps, ce qui indique qu'une fraction entre probablement dans la chaîne métabolique des

catécholamines. Ces observations sont compatibles avec l'affirmation que la [^{18}F]FTYR est un substrat pour la tyrosine hydroxylase. Néanmoins, une identification et une quantification précise des métabolites nécessiteraient de mettre en œuvre une concentration des solutés avant injection en CLHP.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication [Aerts 2008].
<http://www.biomedcentral.com/1756-6649/8/4>

L'ensemble de ces données confirment que la [^{18}F]FTYR est un traceur adapté pour l'étude de la vitesse de synthèse des protéines cérébrales *in vivo*. Etant donné l'influence des protéines sur l'activité plasmatique, une correction tenant compte de ce métabolisme sera nécessaire pour une interprétation quantitative des données collectées en TEP. L'influence des métabolites non précipités est moindre.

Jusqu'à présent, l'utilisation des acides aminés marqués au fluor-18 s'est focalisée sur l'imagerie tumorale, pour laquelle l'incorporation dans les protéines n'est pas une condition nécessaire. Dans ce créneau, le fait que la [^{18}F]FTYR soit incorporée dans les protéines pourrait ne pas constituer un réel avantage car certaines études indiquent que le phénomène principal conduisant à une augmentation de l'accumulation de acides aminés marqués est l'augmentation du transport vers les cellules plutôt que de la vitesse de synthèse des protéines. Par exemple, l'accumulation cérébrale de L-[S-méthyl- ^{11}C]méthionine chez la souris n'est pas influencée par l'utilisation d'un inhibiteur de la synthèse des protéines. Dans les mêmes conditions, l'accumulation de [^{18}F]FTYR est partiellement réduite [Ishiwata 1993]. Dans une autre étude évaluant la [^{18}F]FTYR pour des patients avec gliomes [Wienhard 1991], la modélisation pharmacocinétique des résultats indiquait que la différence principale entre les tissus normaux et tumoraux était une augmentation significative de la vitesse du transport du plasma vers le tissu.

Pour l'imagerie tumorale, l'évaluation de la [^{18}F]FTYR est en cours, notamment au CHU de Liège avec lequel le CRC collabore. Pour l'imagerie sur corps entier, le traceur a montré une moindre sensibilité que le [^{18}F]FDG pour la détection de tumeurs diverses (lymphomes, tumeurs pulmonaires). Des résultats faux négatifs sont expliqués par un signal tumeur/tissus de référence bas [Hustinx 2003]. Une série réalisée pour des méningiomes de la base du crâne montre, par contre, un possible avantage de l'imagerie

métabolique, par rapport à la résonance magnétique utilisée actuellement pour le suivi de ce type de maladie, pour la visualisation précise de son extension [Rutten 2007]. Et dans une autre étude relative à des tumeurs cérébrales primaires, la [^{18}F]FTYR a permis d'obtenir un meilleur contraste tumeur/tissus environnants [Lovinfosse 2008].

L'utilité de la [^{18}F]FTYR pour l'imagerie non oncologique n'a pas été démontrée à ce jour. Ce créneau d'applications neurologiques constitue toutefois un potentiel important pour favoriser l'usage des traceurs incorporés par rapport aux traceurs du seul transport transmembranaire. Un autre aspect important est la facilité de production du traceur. Actuellement, ce facteur joue en faveur du traceur de transport [^{18}F]FET (O-(2-[^{18}F]fluoroéthyl)-L-tyrosine) [Langen 2006]. Le développement de nouvelles méthodes de production automatisée de la [^{18}F]FTYR est actuellement en cours dans les laboratoires du CRC. Des résultats très encourageants, externes à ce travail, ont été obtenus [Lemaire, communication personnelle]. Ces conditions favoriseront l'étude de ses applications potentielles et, peut-être, la généralisation de son utilisation polyvalente.

I.9 CONCLUSIONS DE LA SECTION I

L'étude métabolique sur la 2-[^{18}F]fluoro-L-tyrosine confirme le potentiel de ce traceur pour l'étude de la vitesse de synthèse des protéines cérébrales *in vivo*. L'interprétation quantitative des données obtenues en TEP nécessite une correction tenant compte de l'apparition des métabolites plasmatiques. Les tendances observées devraient être confirmées par une étude statistique réalisée sur un plus grand nombre d'observations.

Des progrès dans les méthodes de synthèse du traceur doivent être réalisés pour favoriser sa meilleure disponibilité. Les nouvelles méthodes de préparation du [^{18}F]F⁻ présentées dans la section III de ce mémoire pourront être mises à profit dans cette optique.

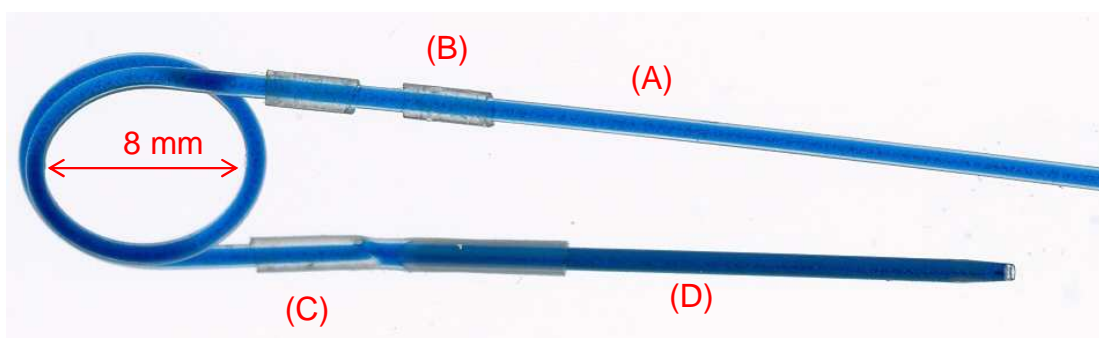
PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

Toutes les expériences animales effectuées dans ce travail ont été préalablement autorisées par le Comité d'Éthique animale de l'Université de Liège.

PI.1 Cathétérisation des rats, adapté de Lestage [Lestage 1985]

Un tuyau de polyéthylène (A) (PE50, diamètre interne 0,58 mm) est enroulé à 540° (1,5 tour) autour d'un tuyau de cuivre de 8 mm de diamètre et chauffé par une immersion dans de l'eau bouillante. Une des extrémités est coupée à 1,5 cm de la boucle thermoformée et l'autre à 20 cm. Sur le long côté, deux pièces de tube en silicone (diamètre interne 0,76mm, longueur 3 mm (B)) sont enfilées jusqu'à environ 1 cm de la boucle avec une petite séparation entre les deux. Sur l'extrémité courte, on enfile sur 0,5 cm un morceau de 1 cm du même tuyau de silicone (C).

L'animal (rat mâle sprague-dawley 180-240g) est anesthésié par injection intra-péritonéale (ketamine 35 mg/kg et médétomidine 0,35 mg/kg). On effectue un rasage ventral du pelage de l'animal ainsi que dans la nuque. Une laparotomie médiane est pratiquée (plans péaucier puis musculaire) et les intestins sont retirés délicatement de la cavité abdominale pour être placés latéralement, protégés par une compresse stérile imbibée de liquide physiologique. De cette manière, le site de cathétérisation est mis à jour. L'aorte abdominale et la veine cave sont dégagées des tissus environnants à l'aide d'un coton tige.



Les deux cathéters sont passés à travers le plan musculaire abdominal gauche, au niveau de la rate, pour émerger après un trajet sous-cutané latéro-dorsal au niveau de la nuque. Les deux cathéters sont fixés au psoas majeur par un point de suture entre les 2 pièces de silicone (B). A l'aide d'une aiguille-cathéter, on implante un cathéter court dans chaque vaisseau (D) et on le relie au cathéter en polyéthylène par un morceau de tube élastique (C). Les intestins sont remis en place en présence de liquide physiologique, puis les plans abdominaux musculaires et péauciers sont suturés. Les extrémités des cathéters sont glissées dans une agrafe chirurgicale et celle-ci est fixée dans la nuque de l'animal. Durant toute l'opération, la table sous l'animal est chauffée pour limiter les pertes de chaleur.

PI.2 Administration, prélèvements, mesures

Les références standards des métabolites potentiels ont été synthétisés par A. Luxen et M. Monclus [Luxen 1993] (3-OMFD, FDOPAC, FDA, FHVA, voir fig. i.1). La 2-fluoro-L-tyrosine et 6-fluoro-L-dopa ont été achetées (SanverTech. Boechout, The Netherlands).

La solution utilisée pour la précipitation des protéines est : $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 100 mg, $\text{NaEDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, acide trichloroacétique 20 g, eau ad 100 mL.

La synthèse de la ^{18}F FTYR a été effectuée par C. Lemaire en appliquant une méthode décrite pour la 6- ^{18}F fluoro-L-dopa et adaptée pour la 2- ^{18}F fluoro-L-tyrosine à partir de triflate de 4-méthoxy-2-triméthylammoniumbenzaldehyde et de (2S)-1-tert-boc-2-tert-butyl-3-méthyl-4-imidazolidinone [Lemaire 1994]. La pureté énantiomérique et l'activité spécifique en fin de synthèse ont été contrôlées systématiquement et étaient toujours supérieures à 95% et 37 GBq/ μmol respectivement.

14 rats (230-410 g) ont été injectés avec 20-325 MBq de ^{18}F FTYR délivrée en bolus dans un maximum de 0,75 mL en 15 secondes via la ligne implantée dans la veine cave. Des échantillons de sang ont été prélevés par la ligne artérielle pendant les premières minutes après injection et ensuite à différents temps (15, 30, 45, 60 et/ou 90 minutes). La ligne de prélèvement a été rincée avec du liquide physiologique entre chaque échantillonnage pour éviter toute perte de perméabilité et pour assurer l'homogénéité de l'échantillon suivant. Les animaux ont été sacrifiés par décapitation à 30, 60, 90, ou 120 minutes. A ce moment, un dernier échantillon de sang était prélevé, ainsi que des échantillons des principaux organes. Le cerveau a été disséqué pour obtenir le striatum, le cortex et le cervelet.

Toutes les mesures d'activité des échantillons biologiques et des fractions collectées en CLHP ont été réalisées avec un compteur NaI (Cobra II autogamma, Packard).

Après centrifugation (5°C, 5 minutes, 5400 g) des échantillons sanguins, la radioactivité d'échantillons pesés de plasma a été déterminée. Pour les temps intermédiaires et le temps final, les protéines des échantillons plasmatiques ont été précipitées de solution d'acide trichloroacétique (plasma/ sol. acide 50/50) et séparées par une nouvelle centrifugation (5°C, 5 minutes, 5400 g). Les activités associées à la fraction précipitée et au surnageant ont été mesurées. Le surnageant a été soumis à la procédure d'analyse en CLHP pour séparer le traceur de ses métabolites.

La radioactivité d'échantillons pesés des organes a été déterminée, de même que celle de la moitié de chacune des trois parties disséquées du cerveau. Les secondes parties ont été soniquées en présence de 500 μL de liquide physiologique (Sonics & Materials inc., Vibracell VXC-400) et leurs protéines précipitées avec la solution d'acide trichloroacétique (500 μL), puis séparées par centrifugation (5°C, 5 minutes, 5400 g). Les activités associées à la fraction précipitée et au surnageant ont été mesurées. Le surnageant a été soumis à la procédure d'analyse en CLHP pour séparer le traceur de ses métabolites.

La séparation du traceur de ses métabolites a été effectuée par une procédure CLHP [Luxen 1993] sur une fraction des surnageants obtenus par précipitation et centrifugation des protéines. Colonne : Phenomenex Bondclone 10 μm C18 300 mm x 3,9 mm. Volume injecté : 100 μL . Phase mobile : 80% d'une solution 0,1M en NaH_2PO_4 , 0,1mM en EDTA, 2,6 mM en octane sulfonate sodique ; 20% méthanol, pH à 3,1. Le débit était de 1 mL/min. Pour certaines analyses, le débit a été augmenté à partir de 8 minutes à 1,5 mL/min. (en 30 s). Des fractions correspondant à 30 s ont été collectées pendant 20 minutes (16 minutes en cas de débit modifié).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aerts 2008 Aerts J., Plenevaux A., Lemaire C., Giacomelli F., Warnock G., Phillips C., Luxen A. **Metabolism of no-carrier-added 2-[¹⁸F]fluoro-L-tyrosine in rats.** BMC Medical Physics 2008;8:4 doi:10.1186/1756-6649-8-4.
<http://www.biomedcentral.com/1756-6649/8/4>
- Ametamay 2008 Ametamey S., Honer M., Schubiger P. **Molecular imaging with PET.** Chem Rev 2008, 108: 1501-1516
- Bodsch 1988 Bodsch W., Coenen H., Stöcklin G., Takahashi K., Hossmann KA. **Biochemical and autoradiographic study of cerebral protein synthesis with [¹⁸F]- and [¹¹C]fluorophenylalanine.** J Neurochem 1988;50:979-983.
- Coenen 1989 Coenen H., Kling, P., Stöcklin G. **Cerebral metabolism of L-[2-¹⁸F]fluorotyrosine, a new PET tracer of protein synthesis.** J Nucl Med 1989;30:1367-72.
- Coenen 1993 Coenen H. **Biochemistry and evaluation of fluoroamino acids.** Dans **PET studies on amino acid metabolism and protein synthesis.** Edité par Mazoyer B., Heiss W., Comar D. chez Kluwer academic publishers, 1993, ISBN 0-7923-2076-X.
- Couturier 2004 Couturier O., Luxen A., Chatal JF., Vuillez JP., Rigo P., Hustinx R. **Fluorinated tracers for imaging cancer with positron emission tomography.** Eur J Nucl Med Mol Imag 2004;31: 1182-1206.
- Dang-Vu 2006 Dang-Vu T.T., Desseilles M, Peigneux P., Maquet P. **A role for sleep in brain plasticity.** *Pediatric Rehabilitation.* 2006;9: 98-118.
- Dejesus 1997 Dejesus O., Endres C., Shelton S., Nickles J., Holden J. **Evaluation of fluorinated m-tyrosine analogs as PET imaging agents of dopamine nerve terminals: comparison with 6-fluorodopa.** J Med Nucl 1997;4: 630-363
- Hustinx 2003 Hustinx R., Lemaire C., Jerusalem G., Moreau P., Cataldo D., Duysinx B., Aerts J., Fassotte M-F., Foidart J., Luxen A. **Whole-body tumor imaging using PET and 2-[¹⁸F]fluoro-L-tyrosine: preliminary evaluation and comparison with [¹⁸F]FDG.** J Nucl Med 2003 ;44:553-539.
- Ishiwata 1993 Ishiwata K., Kubota K., Murakami M., Kubota R., Sasaki T., Ishii S., Senda M. **Re-evaluation of Amino Acid PET Studies: Can the Protein Synthesis Rates in Brain and Tumor Tissues Be Measured In Vivo?** J Nucl Med 1993 ; 34: 1936-1943.
- Jager 2004 Jager P., Chirakal R., Marriott C., Brouwers A., Koopmans K., Gulenchyn K. **6-L-¹⁸F-fluorodihydroxyphenylalanine PET in neuroendocrine tumors: basic aspects and emerging clinical applications.** J Nucl Med 2004;49:573-586.
- Inoue 1998 Inoue T., Tomiyoshi K., Higuichi T., Ahmed K., Sarwar M., Aoyagi K., Amano S., Alyafei S., Zhang H., Endo K. **Biodistribution studies on L-3-[fluorine-18]fluoro-methyl tyrosine: a potential Tumor-detecting agent.** J Nucl Med 1998;40: 399-405.
- Lajtha 1993 Lajtha A., Dunlop D., Banay-Schwartz M. **Cerebral protein turnover: aspects and problems.** Dans **PET studies on amino acid metabolism and protein synthesis.** Edité par Mazoyer B., Heiss W., Comar D. chez Kluwer academic publishers, 1993, ISBN 0-7923-2076-X.

- Langen 2001 Langen K-J., Jarosch M., Hamacher K., Mühlensiepen H., Weber F., Floeth F., Pauleit D., Herzog H., Coenen HH. **Uptake of cis-4-[¹⁸F]fluoro-L-proline in urologic tumors.** J Nucl Med 2001;42: 752-754.
- Langen 2004 Langen K-J., Börner A-R., Müller-Mattheis V., Hamacher K., Herzog H., Ackermann R., Coenen HH. **Imaging of gliomas with cis-4-[¹⁸F]fluoro-L-proline.** Nucl Med & Biol 2004;31: 67-75.
- Langen 2006 Langen KJ., Hamacher K., Weckesser M., Floeth F., Stoffels G., Bauer D., Coenen H., Pauleit D. **O-(2-[¹⁸F]fluoroethyl)-L-tyrosine: uptake mechanisms and clinical applications.** Nucl Med & Biol 2006;33: 287-294.
- Laverman 2002 Laverman P., Boerman O., Corstens F., Oyen W. **Fluorinated amino acids for tumour imaging with positron emission tomography.** Eur J Med Nucl 2002;5: 681-690.
- Lemaire 1994 Lemaire C., Damhaut P., Plenevaux A., Comar D. **Enantioselective synthesis of 6-[¹⁸F]fluoro-L-dopa from no-carrier-added [¹⁸F]fluoride.** J Nucl Med 1994;35:1996-2002.
- Lemaire 2001 Lemaire C., Gillet S., Ooi T., Kameda M., Takeuchi M., Maruoka K., Plenevaux A., Luxen A., **Enantioselective synthesis of 2-[¹⁸F]fluoro-L-tyrosine by catalytic phase-transfer alkylation.** J Labelled Compds Radiopharm 2001;44:S857-59
- Lemaire 2004 Lemaire C., Gillet S., Guillouet S., Plenevaux A., Aerts J., Luxen A., **Highly enantioselective synthesis of no-carrier-added 2-[¹⁸F]fluoro-L-dopa by chiral phase-transfer alkylation.** Eur J Org Chem 2004: 2899-2904.
- Lestage 1985 Lestage P., Vitte P., Rolinat JP., Minot R., Broussolle E., Bobillier P. **A chronic arterial and venous cannulation method for freely moving rats.** J Neurosc Meth 1985;13: 213-222.
- Lovinfosse 2008 Lovinfosse P., Born J., Martin D., Lemaire C., Aerts J., Hustinx R. **Evaluation of primary brain tumors with F-TYR and FDG PET: Correlation with pathology and survival.** J Nucl Med. 2008; 49 (Supplement 1):77P
- Luxen 1993 Luxen A., Monclus M., Hendrickx PY., Masson C. **Synthesis and HPLC separation of 6-[¹⁸F]fluoro-L-dopa metabolites.** Bull Soc Chim Belg 1993, 102: 217-225
- Melega 1889 Melega W., Perlmutter M., Luxen A., Nissenson C., Grafton S., Huang SC., Phelps M., Barrio R. **4-[¹⁸F]fluoro-m-tyrosine: an L-3,4-dihydroxyphenylalanine analog for probing presynaptic dopaminergic function with positron emission tomography.** J. Neurochem 1989;53: 311-313.
- Melega 1990 Melega W., Luxen A., Perlmutter M., Nissenson C., Phelps M., Barrio J. **Comparative in vivo metabolism of 6-[¹⁸F]fluoro-L-dopa and [3H]L-dopa in rats.** Biochem Pharmacol 1990;39: 1853-1860.
- Rutten 2007 Rutten I., Cabay J-E., Withofs N., Lemaire C., Aerts J., Baart V., Hustinx R., **PET/CT of skull base meningiomas using 2-[¹⁸F]fluoro-L-tyrosine: initial report.** J Nucl Med 2007;48: 720-725.
- Shoup 1999 Shoup T., Olson J., Hoffman, Votaw J., Eshima D., Eshima L., Camp V., Stabin M., Votaw D., Goodmann M. **Synthesis and evaluation of [¹⁸F]1-amino-3-fluorocyclobutane-1-carboxylic acid to image brain tumors.** J Nucl Med 1999;40: 331-338.
- Smith 1998 Smith C., Eintrei C., Kang J., Sun Y. **Effects of thiopental anesthesia on local rates of cerebral protein synthesis in rats.** Am J Physiol Endocrinol Metab 1998;274: 852-859.
- Wester 1999 Wester H-J., Herz M., Senekowitsch-Schmidtke R., Schwaiger M., Stöcklin G., Hamacher K. **Preclinical evaluation of 4-[¹⁸F]fluoroprolines: diastereomeric effect on metabolism and uptake in mice.** Nucl Med & Biol 1999;26: 259-265.
- Wienhard 1991 Wienhard K., Herholz K., Coenen H., Rudolf J., Kling P., Stöcklin G., Heiss W-D. **Increased Amino Acid Transport into Brain Tumors Measured by PET of L-(2-¹⁸F)Fluorotyrosine.** J Nucl Med 1991 ; 32: 1338-1346.

SECTION II

Implémentation des polymères à empreinte moléculaire

Pour vous orienter dans cette partie:

ASPECTS THEORIQUES		page
II.1	Introduction	53
II.2	Impression moléculaire sur polymère organique	54
II.3	Intérêt potentiel des MIPs en radiochimie TEP	61
II.4	But du travail dans la section II	63
RESULTATS & DISCUSSION		page
II.5	Fabrication par la méthode classique de polymérisation en masse	65
II.6	Fabrication en phase dispersée	73
II.7	Fabrication par initiation avec un solvant porogène radioactif	84
II.8	Conclusions de la section II	89
PROTOCOLES EXPERIMENTAUX		page 92
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		page 97

Les données relatives à cette partie seront publiées plus tard.

SECTION III

Préparations et mise en oeuvre sans évaporation de [¹⁸F]fluorure réactionnel pour les substitutions nucléophiles aliphatique et aromatique

Pour vous orienter dans cette partie:

ASPECTS THEORIQUES		page
III.1	Introduction	100
III.2	La réactivité du [¹⁸ F]fluorure	103
III.3	Méthodes de séchage appliquées en radiochimie du fluor-18	132
III.4	Milieus offrant une tolérance à l'eau pour le marquage au fluor	134
III.5	But du travail dans la section III	143

RESULTATS & DISCUSSION		page
III.6	Informations & résultats préliminaires	146
III.7	Liquides ioniques	149
III.8	Alcools tertiaires	170
III.9	Phases ioniques	174
III.10	Phases non ioniques	192
III.11	Conclusions de la section III	269

PROTOCOLES EXPERIMENTAUX	page 270
--------------------------	----------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	page 279
-----------------------------	----------

Les données relatives à cette partie seront publiées plus tard.

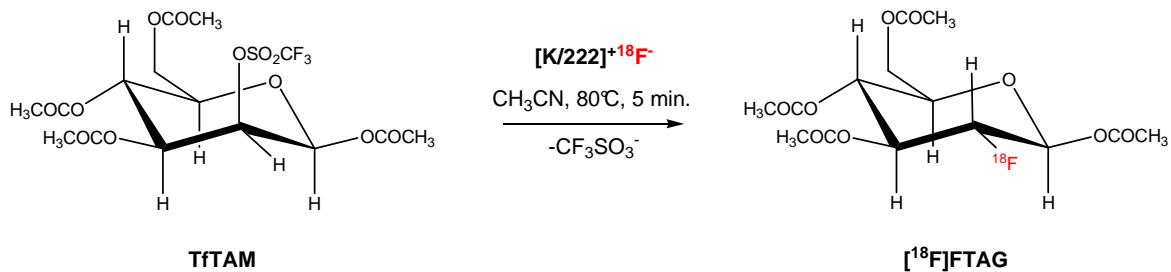
ABREVIATIONS

CCM	Chromatographie sur couche mince
CHLP	Chromatographie liquide à haute pression (anglais: HPLC)
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène
DCM	Dichlorométhane
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMSOs	Diméthylsulfoxyde sec, DMSO séché sur tamis moléculaire
E2	Élimination bimoléculaire
EOB	Moment de fin de tir (End of Bombardment)
EOS	Moment de fin de synthèse (End Of Synthesis)
EPS	Extraction en Phase Solide (anglais: SEP)
IL	Liquide ionique
ILs	Liquides ioniques
K222	kryptofix K222
KF	Karl Fischer
MIP	Molecularly Imprinted Polymer
NICS	Non IoniC Support
NIP	Non Imprinted Polymer
PEG	Polyéthylène glycol
QMA	Cartouche pour extraction en phase solide Waters Sep-pak QMA
QMM	"QMA" maison, résine échangeuse d'anions, voir PIII.5
SN1	Substitution nucléophile monomoléculaire
SN2	Substitution nucléophile bimoléculaire
SNAr	Substitution nucléophile aromatique
UA	Usage analytique

Annexe Ai.1 Schéma de synthèse du [¹⁸F]FDG

D'après Lemaire C et coll., J Label Compd Radiopharm 2002;45: 435-447.

Marquage :



Hydrolyse et purification

