

## Mémoire, Partim B

**Auteur** : Ngassam Ketchongue, Elfried Vannel

**Promoteur(s)** : Dammicco, Sylvestre

**Faculté** : Faculté des Sciences

**Diplôme** : Master en sciences chimiques, à finalité approfondie

**Année académique** : 2024-2025

**URI/URL** : <http://hdl.handle.net/2268.2/22650>

---

*Avertissement à l'attention des usagers :*

*Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.*

*Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.*

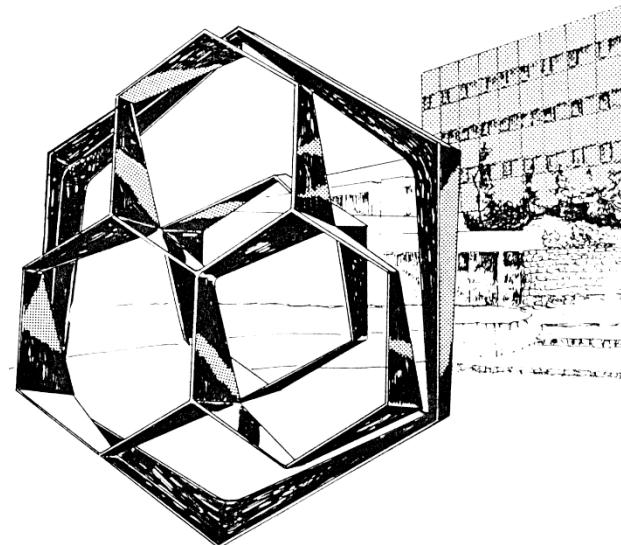
---



**FACULTE DES SCIENCES**  
**Département de Chimie**

**Centre de Recherche du Cyclotron – Thibault Gendron**

**Synthesis and evaluation of novel prosthetic groups for the radiolabelling of biomolecules through bioconjugation or pretargeting**



Année académique 2024-2025

Dissertation présentée par  
Elfried Vannel Ngassam Ketchongue  
en vue de l'obtention du diplôme de  
Master en Sciences Chimiques



## Table des matières

1	INTRODUCTION GENERALE.....	1
2	REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	3
2.1	Tomographie par Emission de Positons.....	4
2.2	Fluor-18 .....	6
2.2.1	Cyclotron et production de fluor 18 .....	6
2.2.2	Fluoration nucléophile.....	8
2.3	Nouvelles méthodes de marquage en dernière étape.....	11
2.4	Radiomarquage des biomolécules .....	13
2.4.1	Marquage direct.....	13
2.4.2	Marquage indirect des biomolécules.....	16
2.5	But et objectifs du mémoire.....	21
3	RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	25
3.1	Synthèse du catalyseur tétrakis (triphénylphosphine) palladium (0) .....	26
3.2	Synthèse du N-succinimidyl - 4 - (triméthylstanny) benzoate.....	28
3.2.1	Analyse retrosynthétique du précurseur 1.....	28
3.2.2	Synthèse du précurseur 1 .....	28
3.3	Synthèse du N-(2-maléimidoéthylamine) paratriméthylstanny benzylamide .....	34
3.3.1	Analyse retrosynthétique du précurseur 2.....	34
3.3.2	Synthèse du précurseur 2 .....	34
3.4	Synthèse du 3-phényl (4'- triméthylstanny) -1,2,4,5- tétrazine .....	39
3.4.1	Analyse retrosynthétique du précurseur 3.....	39
3.4.2	Synthèse du précurseur 3 .....	39
3.5	Synthèse du radiotraceur 3- ( $[^{18}\text{F}]$ parafluorophényl) -1,2,4,5- tétrazine.....	43
3.5.1	Analyse retrosynthétique du traceur radiochimique 3- ( $[^{18}\text{F}]$ parafluorophényl) - 1,2,4,5- tétrazine .....	43
3.5.2	Synthèse du radiotraceur 3- ( $[^{18}\text{F}]$ parafluorophényl) -1,2,4,5- tétrazine.....	43
4	CONCLUSION.....	49
5	PERSPECTIVES FUTURES .....	51
6	PARTIE EXPERIMENTALE.....	53
6.1	Partie chimie organique .....	54
6.1.1	Matériels .....	54
6.1.2	Méthodes expérimentales.....	56
6.2	Partie radiochimie .....	60
6.2.1	Considérations générales .....	60

6.2.2	Radiosynthèse automatisée du traceur [18F] 3-parafluorophényl -1,2,4,5-tétrazine .....	60
7	ANNEXES .....	64
8	REFERENCES .....	71

## REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait jamais vu le jour sans le soutien et l'encouragement de certaines personnes. Mes sincères remerciements :

Au Professeur **Thibault Gendron**, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail, pour ses conseils, ses encouragements, sa disponibilité, sa simplicité et sa rigueur dans le travail.

Au Docteur **Sylvestre Dammicco**, pour ses conseils, ses encouragements, sa disponibilité au quotidien dans l'évolution de mon travail ; sa supervision dans mes recherches.

À tous les **Enseignants du département de chimie de l'université de Liège** pour leur encadrement et la formation de base qu'ils m'ont fait acquérir.

À mes aînés de laboratoire **Adrien Stouse, Shagana Muruganantham et Rhizlaine Kribii** pour leurs conseils, leurs critiques constructives et leur disponibilité au quotidien aussi bien dans les manipulations que dans la rédaction.

À tous mes camarades de laboratoire et de promotion, en particulier **Guillaume Dubois et David Lê** qui ont toujours été là pour me soutenir me réconforter et m'encourager à toujours aller de l'avant.

A ma **Famille** pour leur soutien et encouragement, leurs attentions et leurs motivations.

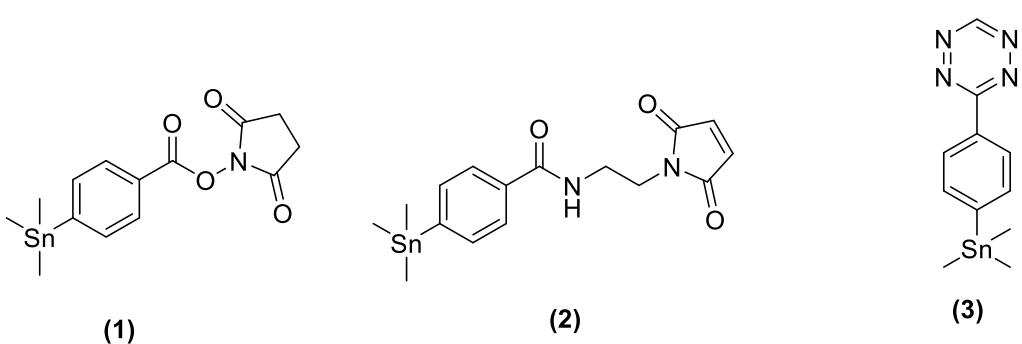
Que tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce mémoire trouvent ici ma profonde gratitude.

## LISTE DES ABBREVIATIONS, SYMBOLES

ADIBO	Azadibenzocyclooctyne
AE/ EP	Acétate d'éthyle/ Ether de pétrole
COSY	Corrélation Spectroscopique
CRC	Centre de Recherche du Cyclotron
CT	Tomodensitométrie
CuAAC	Cycloaddition Azoture-Alcyne catalysée par le Cuivre
DCC/ DCU	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide/ Dicyclohexyluréé
DIPEA	Diisopropyléthylamine
[ <sup>18</sup> F]FBA	<sup>18</sup> F-fluorobenzaldéhyde
[ <sup>18</sup> F]SFB	N-succinimidyl-4- <sup>18</sup> F-fluorobenzoate
[ <sup>18</sup> F]FBEM	N-(2-(4- <sup>18</sup> F-fluorobenzamido) éthyl) maléimide
IEDDA	Demande électronique inverse de Diels Alder
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
MRP	Médicaments RadioPharmaceutiques
PTC	Catalyseur de Transfert de Phase
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SN <sub>2</sub> /Ar	Substitution Nucléophile de type 2/aromatique
SPAAC	Cycloaddition Azoture-Alcyne activée par la Contrainte
UPLC-MS	Chromatographie Liquide Ultra Performante couplée à la Spectrométrie de masse
TCO	Transcyclooctène
TEP	Tomographie par Emission de Positons
TSTU	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl- O-( <i>N</i> -succinimidyl) uronium tetrafluoroborate

## RESUME

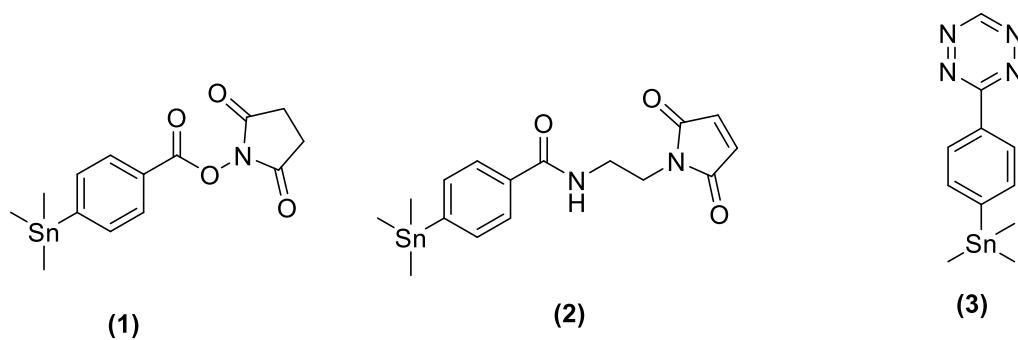
La tomographie par émission de positons est une technique d'imagerie médicale non invasive permettant d'imager un processus biologique grâce à l'utilisation d'une molécule bioactive portant un atome radioactif. Du fait de ses nombreuses propriétés chimiques, et de sa demi-vie, le fluor-18 est l'isotope radioactif le plus approprié pour le développement des traceurs TEP. L'utilisation de biomolécules (Nanobody, peptide, protéine, etc.) comme traceurs PET permet d'obtenir une sélectivité accrue comparée aux petites molécules. Cependant, la chimie de l'introduction du fluor-18 sur ces biomolécules présente encore des défis majeurs à relever notamment via l'utilisation des groupes prosthétiques. Ces derniers servant de lien entre l'isotope radioactif et la biomolécule cible, permettent un radiomarquage de ces biomolécules avec une plus grande efficacité et une plus grande précision. Les difficultés étant liées à l'activation du noyau aromatique d'une part et aux étapes de radiomarquage d'autre part; une création de nouvelles voies de synthèses et de radiomarquage peut apporter une différence significative dans le processus d'acquisition des précurseurs. C'est dans ce sens que la synthèse et l'évaluation de nouveaux groupes prosthétiques pour le radiomarquage des biomolécules par bioconjugaison et le préciblage a permis l'obtention de trois précurseurs stannylés (**Figure1**) à savoir: le N-succinimidyl - 4 - (triméthylstannylyl) benzoate (1) (0,4645g; 1,22mmol; 84%), le 3-phényl (4'-triméthylstannylyl) -1,2,4,5- tétrazine (2) (0,2554g; 0,796mmol; 45%), et le N-(2-maléimidoéthylamine) paratriméthylstannylbenzylamide (3) (0,2116g; 0,52mmol; 64%). Le travail présenté dans ce rapport met en exergue, les méthodes de synthèse de ces différents précurseurs, les difficultés rencontrées et les moyens mis en œuvre afin de contourner ces difficultés, et un début de radiomarquage de certains de ces précurseurs. En apportant des solutions chimiques avancées au problème de radiomarquage, cette étude permet d'espérer des applications plus larges et plus efficaces dans la médecine moderne.



**Figure1:** Précurseurs stannylés synthétisés.

## ABSTRACT

Positron emission tomography is a non-invasive medical imaging technique that uses a bioactive molecule carrying a radioactive atom to image a biological process. Because of its many chemical properties and half-life, fluorine-18 is the radioactive isotope of choice for the development of PET tracers. The use of biomolecules (Nanobody, peptide, protein, etc.) as PET tracers offers greater selectivity than small molecules. However, the chemistry of introducing fluorine-18 onto these biomolecules still presents major challenges, despite the use of prosthetic groups. The latter act as a link between the radioactive isotope and the target biomolecule, enabling these biomolecules to be radiolabeled with greater efficiency and precision. The difficulties being linked to the activation of the aromatic ring on the one hand, and to the radiolabeling steps on the other, the creation of new synthesis and radiolabeling routes can make a significant difference to the precursor acquisition process. With this in mind, the synthesis and evaluation of new prosthetic groups for radiolabeling of biomolecules by bioconjugation and pre-targeting has enabled us to obtain three stannylated precursors (**Figure1**): N-succinimidyl - 4 - (trimethylstannyl) benzoate (1) (0.4645g; 1.22mmol; 84%), 3-phenyl (4'- trimethylstannyl) -1,2,4,5- tetrazine (2) (0.2554g; 0.796mmol; 45%), and N-(2-maleimidoethylamine) paratrimethylstannylbenzylamide (3) (0.2116g; 0.52mmol; 64%). The work presented in this report highlights the methods used to synthesize these different precursors, the difficulties encountered and the means implemented to overcome them, and a first step towards radiolabeling some of these precursors. By providing advanced chemical solutions to the problem of radiolabeling, this study opens up the prospect of broader and more effective applications in modern medicine.



**Figure1:** synthesized stannylated precursors.

# **1 INTRODUCTION GENERALE**

Le monde scientifique a connu un essor considérable au XXe siècle avec l'arrivée de la médecine nucléaire. Cette dernière est une spécialité médicale impliquant l'application de substances radioactives dans le diagnostic et le traitement des maladies<sup>1</sup>. La médecine nucléaire prend son essor en 1934 avec la découverte de radionucléides produits artificiellement par le couple Frédéric et Irène Joliot-Curie<sup>2</sup>. Depuis lors, la médecine nucléaire a acquis une reconnaissance publique et de nombreux chercheurs ont réalisé de nouveaux développements dans ce domaine. On recense cependant près de vingt millions de nouveaux cas de cancer et plus de neuf millions de décès dans le monde. Cela implique une pression sur le système de santé et également un coût très élevé des traitements. Pour pallier à ce problème, de nombreuses recherches sont menées pour mieux comprendre, prédire et traiter ces pathologies<sup>3</sup>. Parmi ces recherches, le marquage au fluor 18 par tomographie par émission de positons représente une des méthodes de diagnostic les plus couramment utilisées en médecine nucléaire. C'est ainsi que nous avons entrepris une synthèse et une évaluation de nouveaux groupements prosthétiques pour le radiomarquage de biomolécules par bioconjugaison ou préciblage. En effet, les biomolécules permettent un ciblage plus spécifique avec une affinité plus élevée que les petites molécules. Le marquage avec des groupes prosthétiques se faisant en une seule étape, permet l'obtention de moins d'impuretés, une plus grande sélectivité et un rendement plus élevé. Ainsi, l'objectif principal de ce projet est de développer une boîte à outils faisant appel aux chimies les plus récentes pour permettre le radiomarquage de biomolécules. Il sera question de partir d'une part de la synthèse des précurseurs tels que le  $[^{18}\text{F}]\text{FSB}$ , le  $[^{18}\text{F}]\text{FBEM}$  obtenus cette fois en une étape de marquage, et d'autre part de synthétiser le nouveau précurseur 3-( $[^{18}\text{F}]$ parafluorophényl)-1,2,4,5-tétrazine; tout en passant par des dérivés de l'étain. Ce mémoire, qui présente l'essentiel de notre travail, comprend trois chapitres :

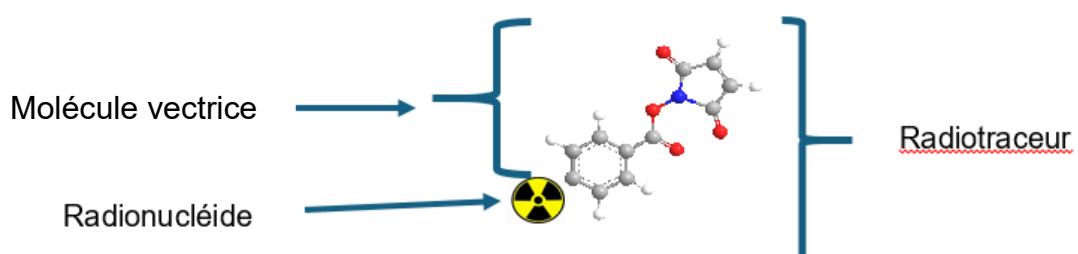
- Le premier chapitre, qui est une revue de la littérature, qui replace le travail dans son contexte.
- Les résultats obtenus après différentes synthèses sont présentés et discutés dans le deuxième chapitre.
- Le matériel et les méthodes utilisés lors de ces différentes synthèses sont explicités dans le troisième chapitre.

## 2 REVUE DE LA LITTÉRATURE

La médecine nucléaire est une discipline médicale régie par l'étude de la biodistribution des médicaments radiopharmaceutiques utilisés. Les MRP sont généralement administrés soit par voie vasculaire, soit de façon dynamique au cours du temps dans le but d'obtenir des informations uniques sur le fonctionnement normal ou pathologique de l'organisme. La médecine nucléaire joue à la fois un rôle d'exploration fonctionnelle et d'exploration biochimique et donc est une technique d'imagerie biologique complémentaire des autres techniques d'imagerie anatomique et fonctionnelle. Elle a évolué au cours du temps à travers l'utilisation de différents systèmes de détection en fonction de la biodistribution des MRP, le radionucléide utilisé (émetteur gamma ou émetteur de positons), le plus ou moins grand besoin d'identification anatomique<sup>1</sup>. Parmi ces systèmes de détection, la Tomodensitométrie (CT), l'IRM, la Tomographie par Emission de Positons (TEP) ou Positron Emission Tomography (PET) en anglais représentent les techniques les plus utilisées. Étant donné que certaines maladies ne présentent pas d'anomalies anatomiques structurelles ou n'apparaissent qu'à des stades plus avancés, la TEP est donc principalement utilisée à travers l'imagerie TEP fonctionnelle (c'est-à-dire pour suivre les modifications des processus biologiques) contrairement à la tomodensitométrie et à l'IRM qui fournissent uniquement des images de l'anatomie justifiant le choix de son utilisation<sup>4,5</sup>.

## 2.1 Tomographie par Emission de Positons

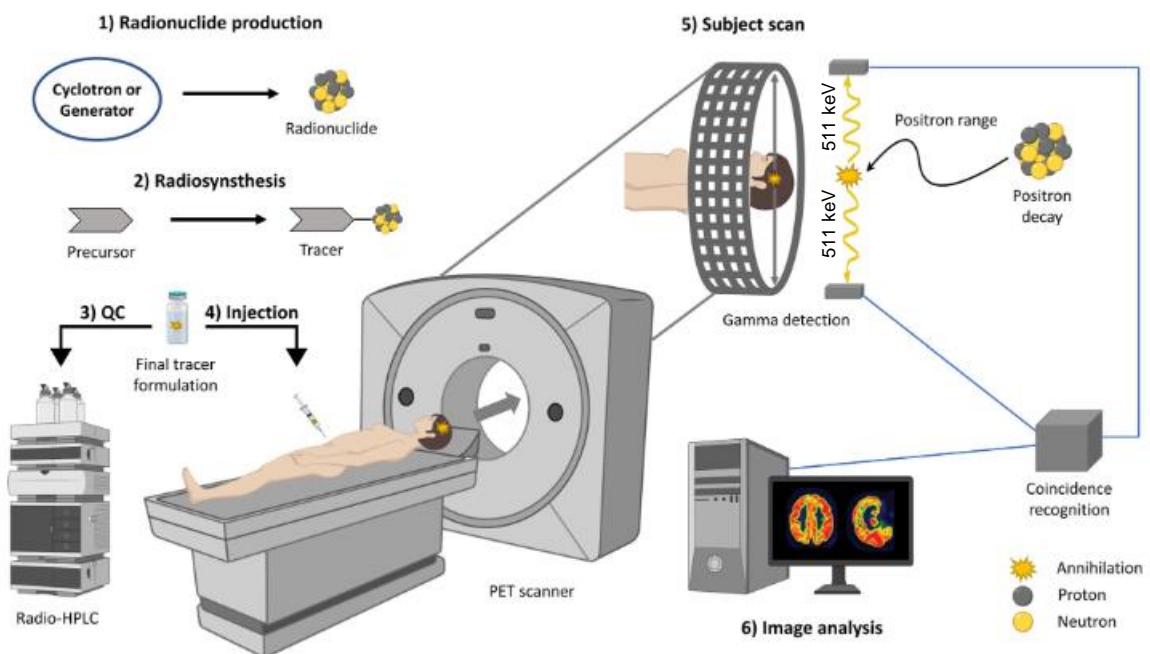
La tomographie par émission de positons est une technique d'imagerie médicale qui permet d'obtenir une image du fonctionnement d'un organe par injection d'un radiotraceur *in vivo*<sup>6</sup>. Ce dernier peut être défini comme une substance contenant un isotope radioactif émetteur de positon utilisé pour suivre le cheminement d'une molécule dans un système biologique, chimique ou physique<sup>7</sup>. (**Figure 2**).



**Figure 2** : Un radiotraceur, composé d'un radionucléide et d'une molécule biologiquement active.

La tomographie par émission de positons possède une vitesse d'acquisition suffisante et ce, généralement, dans le but de déterminer la pharmacocinétique et la

distribution des radiotraceurs<sup>8</sup> (**Figure 2**). La collecte des données est effectuée par un réseau de détecteurs positionnés autour du patient. Ces détecteurs sont équipés de scintillateurs sélectionnés en fonction de diverses propriétés afin d'optimiser le rapport signal/bruit. Le circuit de coïncidence détecte les deux photons gamma de 511 keV émis en directions opposées suite à l'annihilation d'un positon par superposition à un électron présent dans les tissus humains du fait de leur collision (**Figure 3**). En utilisant des algorithmes sophistiqués adaptés aux acquisitions tridimensionnelles, les coupes tomographiques sont ainsi reconstruites<sup>9,10</sup>.



**Figure 3:** Processus d'acquisition du PET Scan inspiré de Jian Rong et al<sup>9</sup>.

La tomographie par émission de positons, lorsqu'elle est combinée avec un radiopharmaceutique validé, permet de fournir des images interprétatives de fonctions biologiques spécifiques. Outre son utilisation dans le diagnostic des maladies, l'imagerie TEP offre des informations cruciales pour la découverte et le développement de nouveaux médicaments, tout en aidant à minimiser les effets secondaires dus à des interactions non ciblées. Le développement de nouveaux radiotraceurs spécifiques et validés pour des cibles cliniquement pertinentes, ainsi que l'optimisation des méthodes pour leur synthèse, constitue l'aspect le plus déterminant pour l'avenir de la technologie TEP<sup>11</sup>. Le principe de la TEP consiste en la détection des radionucléides émetteurs de positons (**Tableau 1**), émis lors de l'annihilation des positrons afin de produire des images fonctionnelles de l'organisme<sup>12</sup>.

**Tableau 1:** Comparaison de quelques radionucléides<sup>10</sup>.

Eléments	<sup>15</sup> O	<sup>13</sup> N	<sup>11</sup> C	<sup>18</sup> F
Demi-vie (min)	2.1	10,0	20.4	109.8
Energie cinétique probable (Mev)	0,73	0,49	0,39	0,25
Energie cinétique maximale (Mev)	1,72	1,19	0,98	0,63
Libre parcours moyen dans l'eau (mm)	2,7	1,5	1,1	0,6

## 2.2 Fluor-18

Parmi les radionucléides, le fluor-18 est généralement le plus utilisé pour le marquage des produits radiopharmaceutiques d'une part à cause de sa demi-vie idéale et d'autre part en raison de ses propriétés chimiques, physiques et nucléaires idéales<sup>12</sup>. Il est particulièrement adapté pour le marquage des radiopharmaceutiques en TEP, grâce à ses propriétés distinctives : une demi-vie relativement longue de 109,80 minutes, des niveaux d'énergie des positons émis relativement bas ( $E_{\max} = 0,635$  MeV), une probabilité élevée de désintégration par émission de positons (97 %), et un petit rayon de Van der Waals (1,47 Å). De plus, sa forte électronégativité et sa capacité à former des liaisons robustes avec le carbone (énergie de liaison C–F de 112 kcal/mol) le rendent plus thermiquement stable et plus résistant à l'oxydation que la liaison carbone-hydrogène (C–H = 98 kcal/mol)<sup>13,14</sup>.

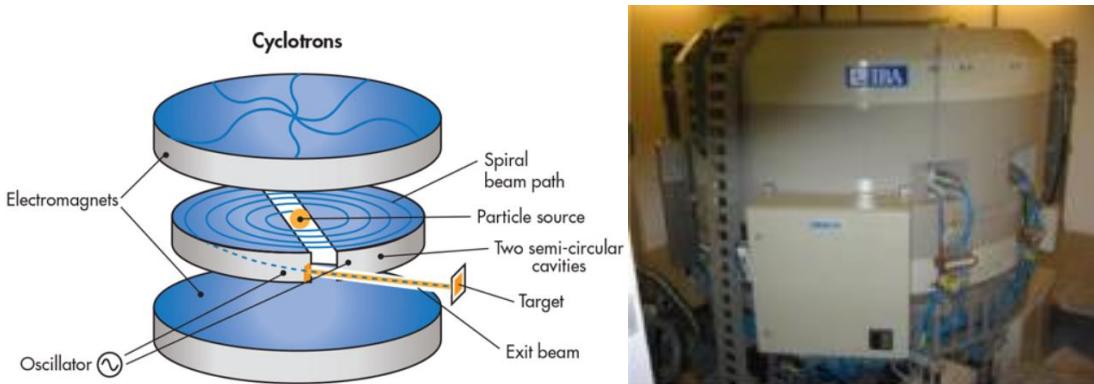
### 2.2.1 Cyclotron et production de fluor 18

Le fluor 18 n'existe pas naturellement, il doit être créé par réaction nucléaire. Étant émetteur  $\beta^+$ , il est généralement produit par cyclotron<sup>8</sup>.

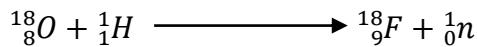
#### 2.2.1.1 Cyclotron

Un cyclotron (**Figure 4**) est un accélérateur de particules utilisant un champ magnétique et un champ électrique oscillant dans le but d'accélérer et confiner les particules chargées à des vitesses très élevées. Il s'agit d'un dispositif composé de deux cavités métalliques en forme de D séparées par un espace étroit. À travers une source (un canon électrostatique) près du centre de l'espace restreint, il y a émission des hydrures qui possèderont une trajectoire curviligne par application d'un champ magnétique uniforme et perpendiculaire au plan des cavités. Une tension alternative appliquée entre les deux électrodes en forme de D génère un champ électrique qui accélère les ions  $H^-$ . À la fin du circuit, ces ions  $H^-$  traversent une fine feuille de carbone, éliminant ainsi les électrons des ions  $H^-$  pour former des protons<sup>16–18</sup>. Ces protons accélérés qui ont une énergie élevée de l'ordre de 1 à 30 MeV (18 MeV pour le cyclotron IBA cyclone 18/9 utilisé au CRC),

bombardent la cible qui contient l'eau enrichie ( $H_2^{18}O$ ). Il y a transformation du  $^{18}O$  en  $^{18}F$  suite à la réaction nucléaire (**Schéma 1**)<sup>17</sup>.



**Figure 4** : Fonctionnement d'un cyclotron (à gauche) et photo du cyclotron du CRC (à droite).



**Schéma 1** : Synthèse du  $^{18}F$  par bombardement de  $^{18}O$  avec des protons.

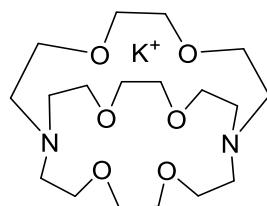
### 2.2.1.2 Production de fluor-18

La production du fluor 18 peut s'effectuer de deux façons en fonction de la nature de la cible et des réactions chimiques souhaitées dans le but d'introduire un atome de fluor 18 dans une structure chimique<sup>19</sup>. Du gaz  $[^{18}F]F_2$  est obtenu lorsque la cible est du  $^{18}O_2$  gazeux (**Schéma 1**)<sup>17</sup>. Lorsque la cible est de l'eau liquide enrichie  $H_2^{18}O$ , une solution aqueuse d'ion fluorure  $[^{18}F]F^-$  est obtenue<sup>20</sup>. Cette dernière est la plus utilisée par les radiochimistes et peut être produite dans la plupart des cyclotrons<sup>9,21</sup>. En effet, la différence entre ces deux modes de production s'explique par : l'activité molaire, le signal de la TEP. L'activité molaire est la mesure de la radioactivité par unité de quantité de matière d'un isotope radioactif. Elle est environ 100 à 1000 fois plus élevée dans le fluor  $^{18}F$  nucléophile que dans le fluor  $^{18}F$  gazeux. En effet, lors de la production du fluor  $^{18}F$  gazeux, il y a ajout du  $[^{19}F]F_2$  comme gaz vecteur pour l'extraction du  $^{18}F$ , entraînant ainsi une dilution du radiotraceur qui causera une saturation du récepteur. Cette dernière va ainsi contribuer à baisser le signal de la TEP et peut également provoquer des effets secondaires<sup>20</sup>. L'incorporation du  $^{18}F$  sur la molécule d'intérêt doit se faire dans un solvant organique. Il est donc nécessaire de se débarrasser de l'eau provenant de la production du  $^{18}F$ . Pour ce faire, les ions  $^{18}F^-$  sont trappés sur une cartouche échangeuse d'ion (type QMA). L'élution des ions fluorures  $[^{18}F]F^-$  adsorbés sur une cartouche échangeuse d'ions nécessite le remplacement des ions fixés par d'autres ions compétitifs grâce à une solution d'élution. Une solution saline (diluée dans de l'acétonitrile/eau) contenant un ion compétitif (comme du  $K_2CO_3$  par exemple) est utilisé

pour éluer les ions fluorures. Ainsi ces ions compétitifs vont remplacer les ions fluorures sur les sites de la résine et va ainsi permettre la libération des ions fluorures dans la solution. Les ions fluorures sont obtenus après évaporation azéotropique de la solution par ajout de l'acétonitrile dans le but d'éliminer l'eau résiduelle<sup>22</sup>.

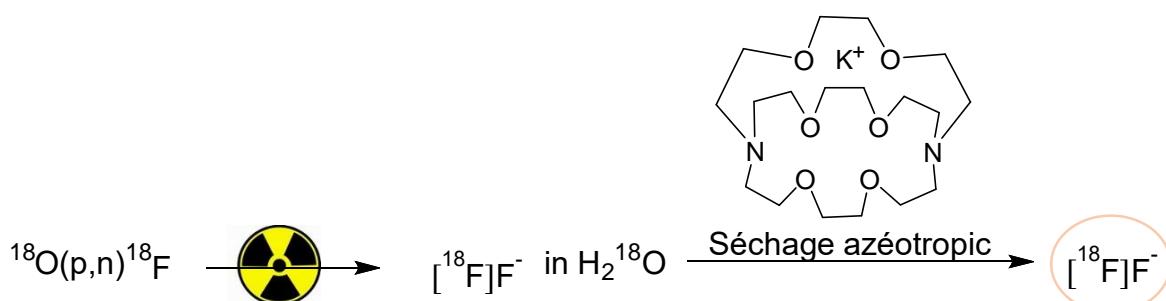
### 2.2.2 Fluoration nucléophile

L'incorporation du fluor peut être réalisée en position aliphatique ou aromatique<sup>9</sup>. Dans ces deux cas le caractère nucléophile de l'ion fluorure doit être renforcée pour l'éviter d'interagir réagir avec les molécules d'eau et ainsi être inefficace à la substitution nucléophile. Pour améliorer ainsi la solubilité et le caractère nucléophile de l'ion fluorure, il est important d'ajouter un chélatant afin d'encager le contre ion (potassium) et renforcer la réactivité des ions fluorures; généralement le cryptand Kryptofix<sub>222</sub> (**Figure 5**) est utilisé (**Schéma 2**).



**Figure 5:** Le Kryptofix (K<sub>222</sub>)

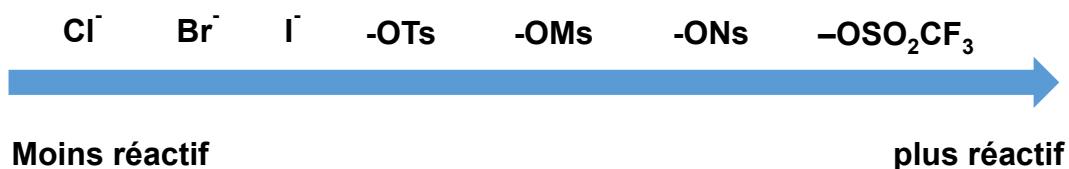
On peut également utiliser un cation volumineux tel que le tétrabutylammonium. L'élimination de l'eau par distillation azéotropique peut se faire avec l'acétonitrile. Après séchage l'introduction du fluorure peut se faire soit par une substitution nucléophile (SN<sub>2</sub>) sur carbone aliphatique, soit par une substitution nucléophile aromatique (SN<sub>Ar</sub>). Les réactions de substitutions nucléophiles se déroulent dans les solvants polaires aprotiques tels que le DMSO ou l'acétonitrile (le plus utilisé). Les rendements radiochimiques étant dépendants des substrats de départ, il est important de maîtriser la nature et les propriétés des substrats et des réactifs<sup>8,19</sup>.



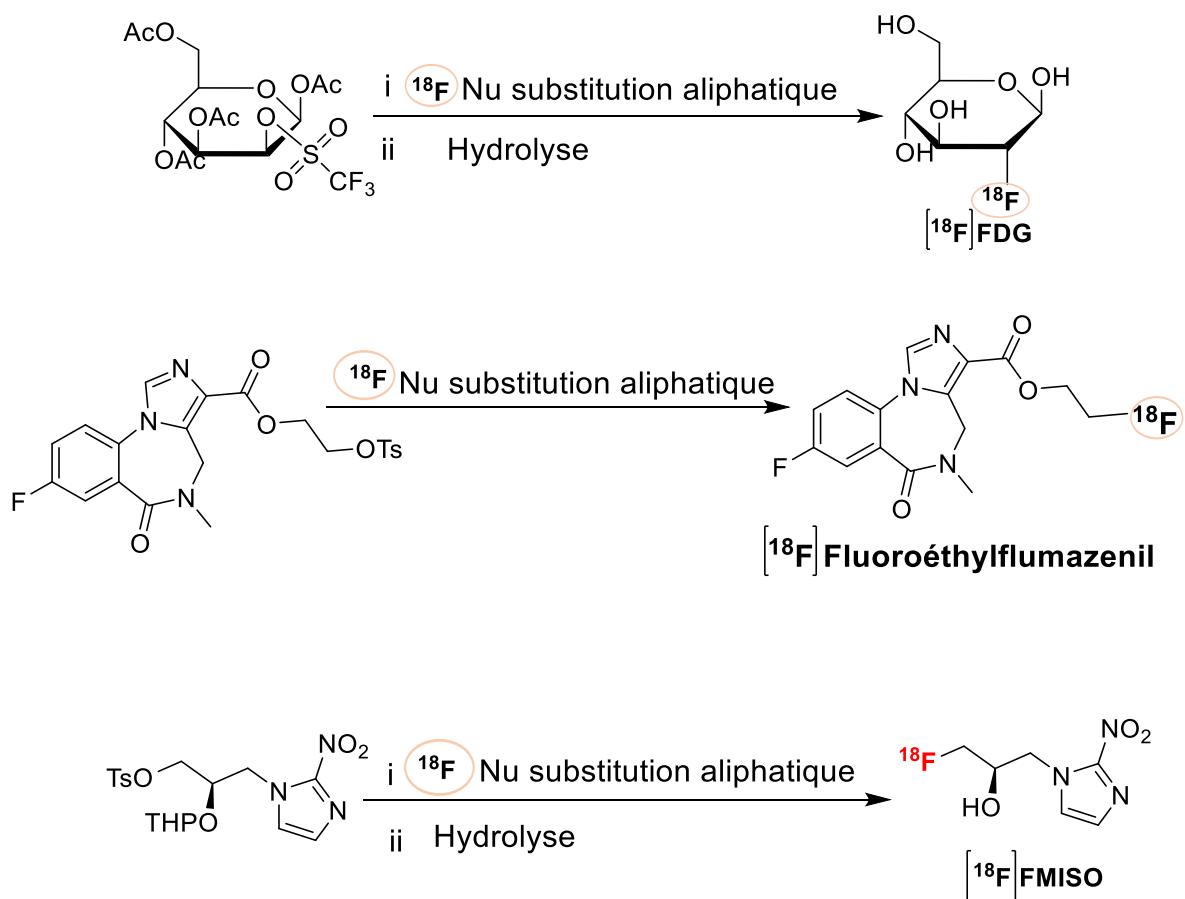
**Schéma 2:** Activation de l'ion fluorure  $[^{18}\text{F}]^{\text{F}}^-$  par le PTC.

### **2.2.2.1 Fluoration nucléophile aliphatique**

La fluoruration nucléophile aliphatique est régie par une réaction de substitution nucléophile ( $SN_2$ ) du fluorure sur une molécule comportant un groupe partant. Le choix de ce dernier est donc primordial car plusieurs critères doivent être pris en compte: sa réactivité (**Schéma 3**) et la stabilité du précurseur face aux conditions basiques de fluoruration. En effet, un mauvais groupement partant, entraînera un mauvais rendement de synthèse et un très bon groupement partant entraînera des réactions secondaires (réaction d'élimination par exemple) dans les conditions basiques. Afin de pallier à ces problèmes il est important de prendre en compte certains paramètres à savoir la température de réaction, le choix d'un contre-anion moins basique, le rapport catalyseur de transfert de phase/précurseur/base. En fonction de ces paramètres, les produits de fluorurations aliphatiques pourront être obtenus soit en une ou plusieurs étapes<sup>17</sup>. Le **Schéma 4** montre plusieurs exemples de réactions de fluorurations aliphatiques.



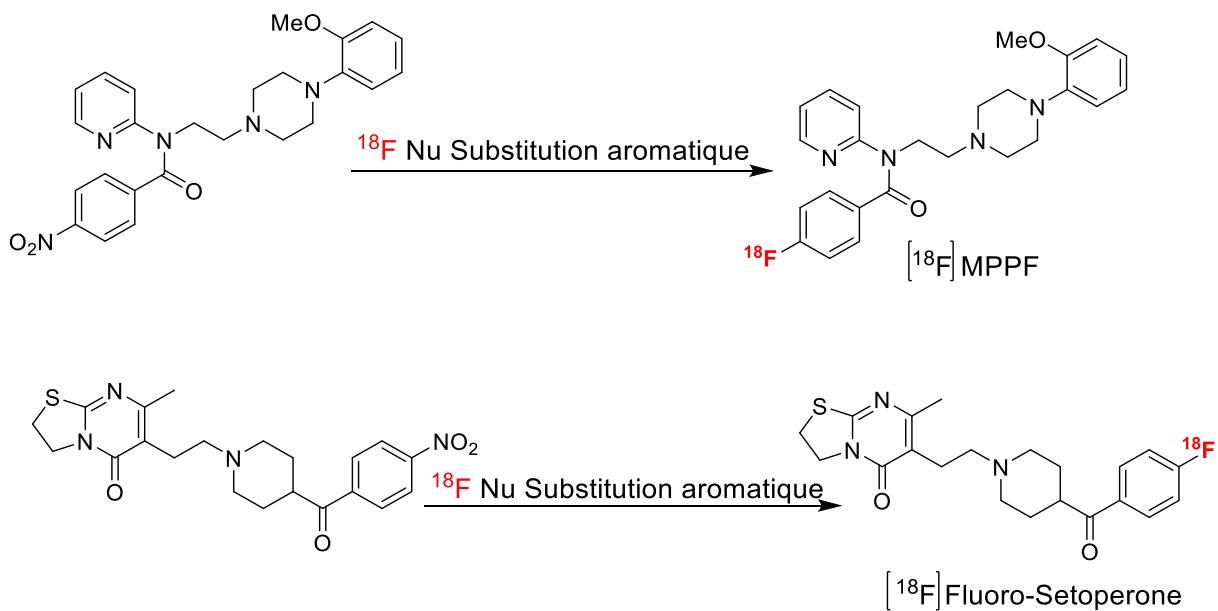
**Schéma 3:** Ordre de réactivité de quelques groupements partants<sup>11</sup>.



**Schéma 4:** Radiofluorinations nucléophiles aliphatiques<sup>8,19</sup>.

### 2.2.2.2 Fluoration nucléophile aromatique

La fluoration nucléophile sur aromatique consiste à incorporer un atome de fluor 18 sur un carbone aromatique par substitution d'un groupement partant. Elle est particulièrement importante pour la synthèse des radiotraceurs car non seulement ses intermédiaires sont plus stables et la modification peut se faire suivant différentes approches<sup>9,19</sup>. La SN<sub>Ar</sub> est réalisée dans les solvants polaires aprotiques et à des températures supérieures à celle des substitutions nucléophiles aliphatiques<sup>23</sup>. Le **Schéma 5** présente quelques réactions de substitution nucléophile aromatiques.



**Schéma 5:** Radiofluorinations nucléophiles aromatiques<sup>8,19</sup>.

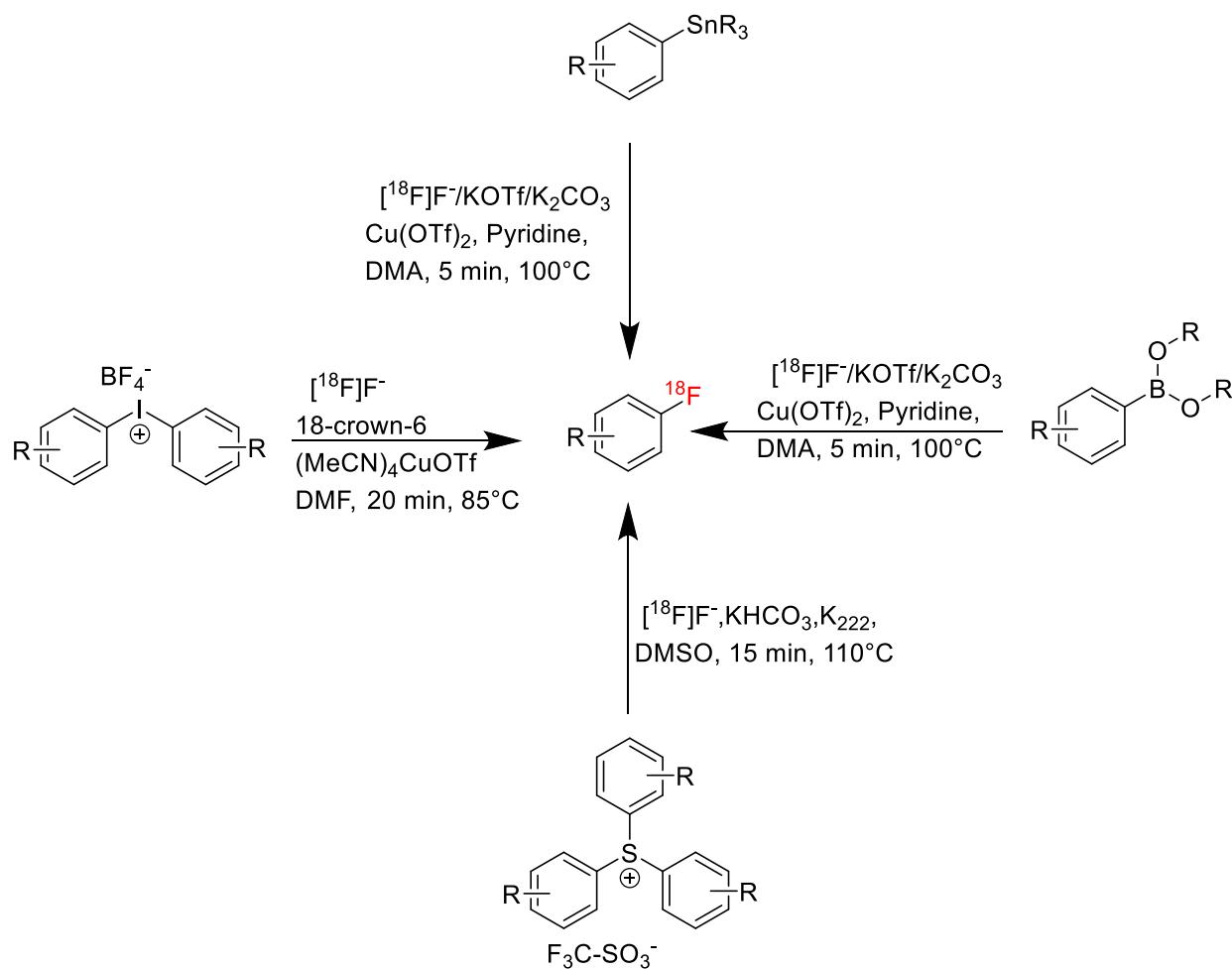
La plupart du temps, pour que les réactions de substitutions nucléophiles aient lieu sur des noyaux aromatiques, il est nécessaire que ceux-ci soient activés (porteurs d'un ou plusieurs groupements électroattracteurs en ortho ou para tels que -NO<sub>2</sub>, -CN, -CO, -CF<sub>3</sub>)...<sup>9,19</sup>. Cette activation bien que rendant possible la substitution nucléophile aromatique, impose des contraintes sur la structure chimique et limite la diversité des composés radiomarqués.

### 2.3 Nouvelles méthodes de marquage en dernière étape

L'utilisation des dérivés aromatiques stannylés joue un rôle très capital dans ce sens où il permet dans un premier temps le radiomarquage des noyaux aromatiques sans nécessité d'activation préalable, élargissant ainsi la gamme de molécules candidates pour le radiomarquage, et dans un second temps il permet un radiomarquage en une seule étape. De plus, la liaison Sn-C est une liaison stable et permettant ainsi la manipulation de la plupart des groupements fonctionnels, les dérivés stannylés peuvent être préparés à partir des produits commercialement disponibles moins chers. Cependant l'inconvénient des dérivés stannylés réside majoritairement au niveau de leur toxicité et de l'élimination des déchets stannylés<sup>24,25</sup>.

De même, il existe des classes de composés (**Schéma 6**) largement utilisées pour le radiomarquage en dernière étape au fluor en raison de leur réactivité chimique et de leur compatibilité avec des conditions douces, c'est le cas des dérivés boroniques, iodonium, sulfonium. Les dérivés boroniques, généralement des acides boroniques et leurs esters réagissent via des réactions de type radiofluoration oxidative en présence des catalyseurs

tels que le cuivre. Elle a pour avantage d'avoir une bonne compatibilité avec des conditions douces, une large disponibilité commerciale et est adaptée pour les cycles aromatiques activés ou non, cependant elle présente des inconvénients liés au rendement et à la sensibilité. En effet son rendement varie en fonction de la nature du substrat, et ils sont sensibles à l'humidité de l'air et donc nécessite des conditions de manipulations rigoureuses<sup>26</sup>. Les dérivés iodonium sont particulièrement adaptés pour le radiomarquage en raison de leur forte réactivité et de leur rendement chimique élevé mais leur synthèse est parfois difficile et donne des possibilités de formation des sous-produits dus à leur haute réactivité<sup>8</sup>. Les dérivés sulfonium sont relativement nouveaux dans le domaine du radiomarquage, il présente une haute réactivité même à basse température, ils sont stables thermiquement et chimiquement mais sont moins disponibles sur le marché et nécessite parfois d'optimisation des protocoles pour certaines structures<sup>25,27</sup>.



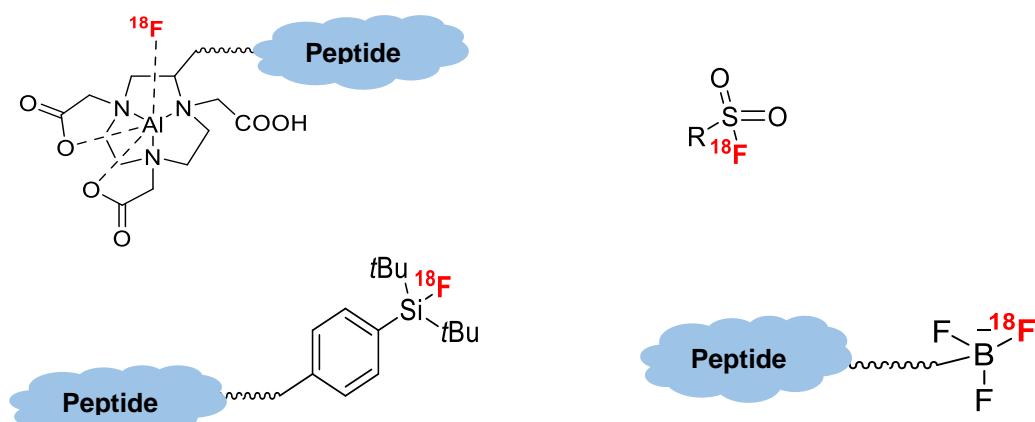
**Schéma 6:** Quelques classes de composés pour le marquage en dernière étape<sup>25,27,28</sup>.

En conclusion, les précurseurs stannylés, boroniques, iodonium, et sulfonium offrent des solutions complémentaires pour le radiomarquage au fluor-18, chacune adaptées à des conditions ou des structures spécifiques. Tandis que les composés boroniques sont bien

établis et polyvalents, les sels d'iodonium se distinguent par leur réactivité élevée, et les précurseurs sulfonium émergent comme une alternative prometteuse pour les motifs complexes. Quant aux précurseurs stannylés, leur stabilité, leur compatibilité avec une grande variété de substrat et leur réactivité dans les conditions douces font d'eux des précurseurs de choix pour le radiomarquage au fluor-18. Ainsi le choix du précurseur dépendra donc des besoins spécifiques de la molécule cible et des conditions expérimentales<sup>25,28</sup>.

## 2.4 Radiomarquage des biomolécules

Le développement d'un radiotraceur est caractérisé par une insertion rapide et une sélectivité du site du radionucléide. Cependant, la formation des liaisons hydrogènes entre les ions fluorures et les molécules d'eau dans les environnements protiques constitue un problème pour le radiomarquage car elle entraîne une réactivité limitée des fluorures et donc une insertion et sélectivité moins bonne. Dans les biomolécules (peptides, protéines...), ces obstacles sont combinés avec les conditions de réactions difficiles et rendent ainsi le processus de marquage plus complexe<sup>29</sup>. Dans le but de faciliter les réactions, il existe de nouvelles méthodes de marquages directs ; qui consistent à incorporer du fluor 18 par formation des liaisons C-<sup>18</sup>F, B-<sup>18</sup>F, Si-<sup>18</sup>F, S-<sup>18</sup>F (**Figure 6**) et des méthodes de marquages indirects; qui consistent à passer par un intermédiaire (groupement prosthétique) suivi de la conjugaison avec la biomolécule<sup>8,13</sup>.



**Figure 6:** Méthodes de marquages directes<sup>9</sup>.

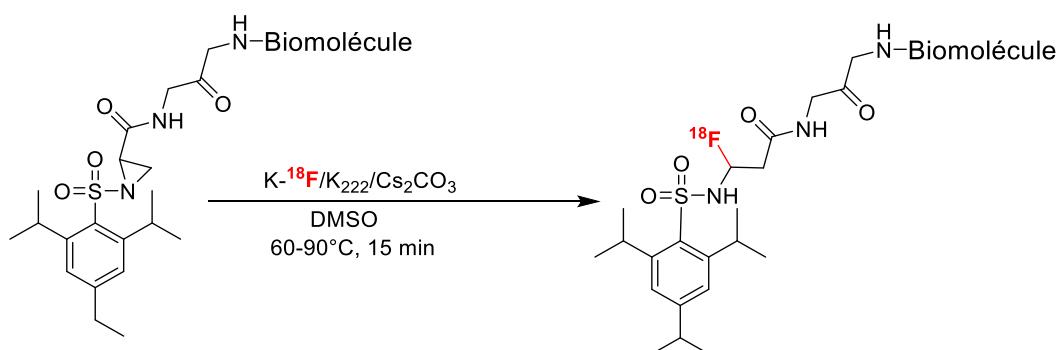
### 2.4.1 Marquage direct

Le marquage direct des biomolécules est une réaction qui consiste à insérer le fluor 18 en une seule étape sur la biomolécule. Son inconvénient est qu'il nécessite de modifier chimiquement les biomolécules préalablement. Compte tenu du fait de la demi-vie du fluor,

il existe des limites sur des méthodes utilisées et la réalisation du marquage. Il est donc important de réduire les étapes de synthèses et le temps de purification nécessaire à l'obtention du produit finales marquées<sup>13</sup>. La formation des liaisons C-<sup>18</sup>F (**Schéma 7**), B-<sup>18</sup>F (**Schéma 8**), Al-<sup>18</sup>F (**Schéma 9**), Si-<sup>18</sup>F, S-<sup>18</sup>F semble être une route viable.

#### 2.4.1.1 Marquage par formation de liaison C-<sup>18</sup>F

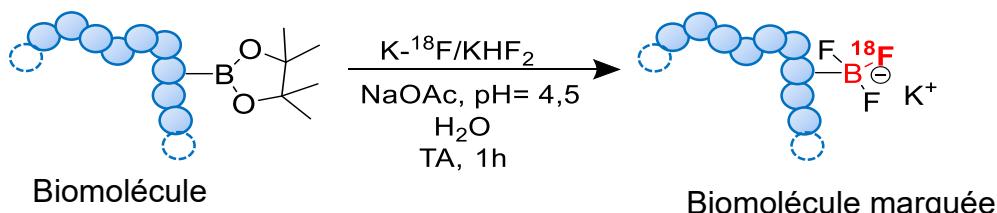
Il s'agit de la substitution d'un groupement partant par du <sup>18</sup>F. De nombreux chercheurs ont étudié différentes méthodes d'insertion du <sup>18</sup>F sur l'atome de carbone des précurseurs des biomolécules, en partant de l'activation du cycle par insertion des groupes attracteurs sur le noyau aromatique jusqu'à l'insertion du <sup>18</sup>F. Les réactions faites en présence de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et K<sub>222</sub> dans le DMSO ont donné différents rendements radiochimiques en fonction de la nature des substrats et des groupements partants<sup>13</sup>. Le **schéma 7** suivant présente un exemple de marquage direct au <sup>18</sup>F par formation de la liaison C-<sup>18</sup>F où la 2,4,6-triisopropylsulfone a été le groupe optimal pour l'ouverture du cycle de l'aziridine par formation de la liaison C-<sup>18</sup>F<sup>13</sup>. Cette dernière nécessitant souvent une chimie sophistiquée pour permettre une fixation précise du fluor sur la molécule cible fait appel à l'usage d'autres méthodes de marquage.



**Schéma 7:** Exemple de formation de la liaison C-<sup>18</sup>F par radiomarquage<sup>13</sup>.

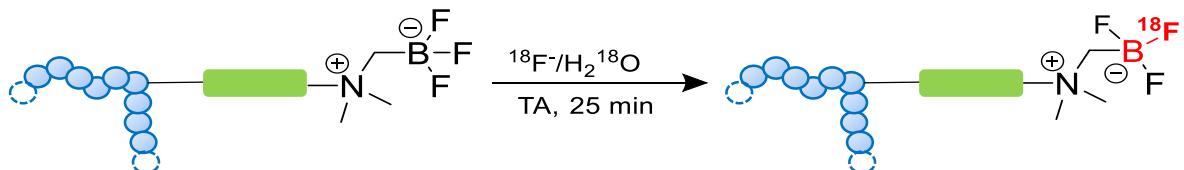
#### 2.4.1.2 Marquage par formation de liaison B-<sup>18</sup>F

Il consiste à remplacer un groupe partant par un fluorure<sup>18</sup>F sur un atome de bore. Il est utilisé depuis le milieu du 20<sup>ème</sup> siècle pour le marquage au <sup>18</sup>F des petites molécules du fait de la rigidité de la liaison B-F<sup>13</sup>. C'est au 21<sup>ème</sup> siècle que Perrin et *al* ont décrit le marquage des biomolécules basé sur la chimie du bore-fluor (**Schéma 8**)<sup>8</sup>.



**Schéma 8:** Exemple de radiomarquage par formation de la liaison B-<sup>18</sup>F<sup>30</sup>.

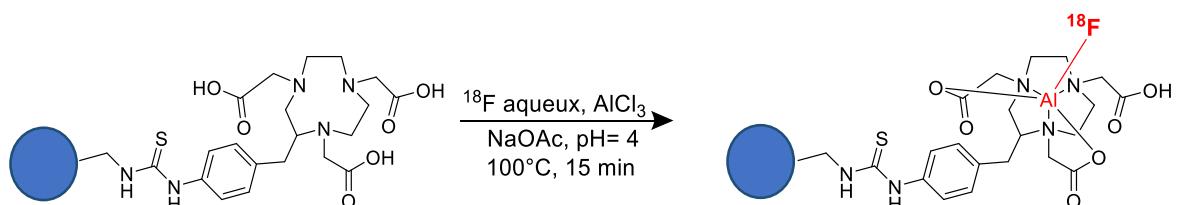
Cependant, étant donné que ce radiomarquage basé sur la substitution électrophile, ne permettant pas d'avoir un grand rendement car il nécessitait l'ajout du  $^{19}\text{F}$  pour augmenter le pourcentage de conversion, Perrin et *al* ont développé une méthode de marquage par échange isotopique  $^{19}\text{F}$ - $^{18}\text{F}$ (**Schéma 9**) qui a présenté une bonne stabilité *in vivo* et une activité molaire élevée<sup>30</sup>.



**Schéma 9:** Echange isotopique de la liaison B- $^{19}\text{F}$ , B- $^{18}\text{F}$  par radiomarquage<sup>30</sup>.

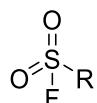
#### 2.4.1.3 Marquage par formation de liaison Al- $^{18}\text{F}$

S'agissant de l'insertion d'un fluorure  $^{18}\text{F}$  sur un atome d'aluminium, des chercheurs tels que Mc Bride et ses collaborateurs ont montré qu'il était possible de former des complexes stables entre le  $^{18}\text{F}$  et certains métaux tels que l'aluminium (**Schéma 10**), sans utilisation de PTC, ni séchage de l'eau par azéotropie<sup>8</sup>. Le marquage nécessite généralement une petite quantité de biomolécules et s'effectue à environ 100°C en 15 min avec un rendement radiochimique élevé. L'utilisation des conditions non physiologiques à savoir un pH faible (inférieur à 5), des températures élevées (supérieures à 100°C) lors du marquage direct a suscité la mise sur pied des méthodes de marquages indirect pour résoudre ce problème<sup>13</sup>.



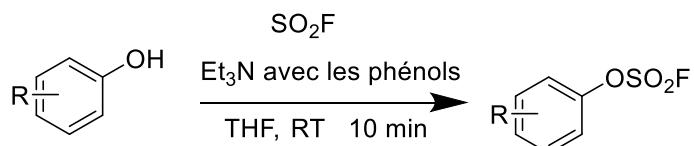
**Schéma 10:** Exemple de formation de la liaison Al- $^{18}\text{F}$  par radiomarquage<sup>8</sup>.

Comme autre techniques de radiomarquage récente on peut inclure les SUFEx (**Figure 7**), qui ont la particularité d'activer les nucléophiles de l'oxygène. Du fait de leur sélectivité en synthèse ils semblent être une voie viable pour le radiomarquage au fluor- $^{18}$ <sup>31</sup>. Le terme SUFEx (Sulfur Fluoride Exchange) désigne une réaction chimique utilisée et introduite dans le cadre de la chimie click impliquant l'échange entre chlorure et fluorure afin de former des liaisons covalentes de type fluorure de soufre ( $\text{SO}_2\text{F}$  ou autres dérivés) dans des conditions douces avec une grande sélectivité<sup>32</sup>.



**Figure 7:** Figure générale des SUFEx.

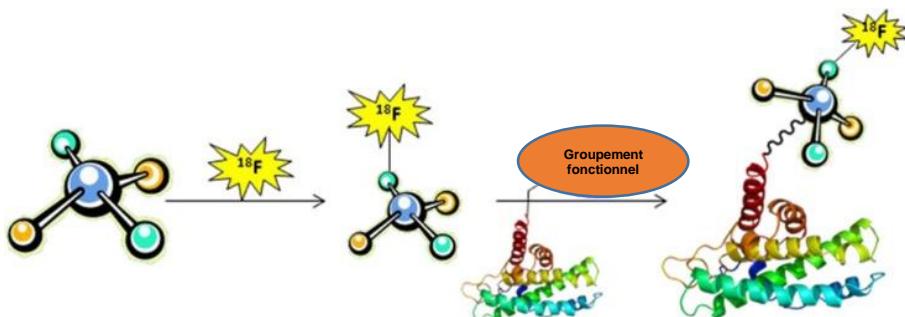
La réaction SUFEx est une substitution nucléophile, où un atome de soufre est attaqué par un nucléophile et conduisant ainsi à la libération d'un ion fluorure  $\text{F}^-$  et à la formation d'une nouvelle liaison covalente stable<sup>33</sup>. Cette réaction est efficace et spécifique, donnant des produits chimiquement et thermiquement stables. Elle peut être réalisée dans les solvants organiques ou en solution aqueuse, souvent à température ambiante. Elle peut être utilisée pour divers substrats, de petites molécules aux polymères et biomolécules<sup>33,34</sup>. Un exemple courant est la réaction de fluorure de sulfonyle ( $-\text{SO}_2\text{F}$ ) avec un composé hydroxylé ( $\text{ROH}$ ) pour former un ester sulfonique ( $\text{RSO}_3$ ) (**Schéma 11**)<sup>35</sup>. Cette réaction est très rapide donne un produit stable<sup>36</sup>.



**Schéma 11:** Préparation des esters sulfoniques.

#### 2.4.2 Marquage indirect des biomolécules

Le marquage indirect passe par l'intermédiaire d'un groupement prosthétique qui à travers diverses réactions de conjugaison (comme par exemple l'alkylation, l'acylation, l'amidation, la formation de liaison oxime,...) se lie à la biomolécule via des fonctions déjà présente sur celle-ci (amine des lysine, thiol des lysine, etc) (**Schéma 12**)<sup>13</sup>.

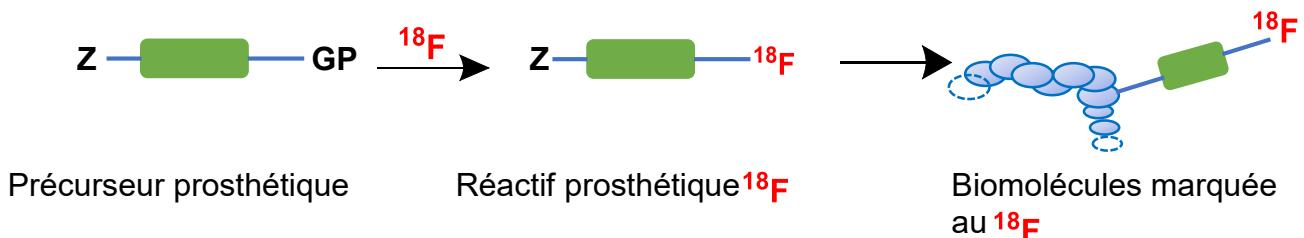


**Schéma 12:** Schéma générale d'un marquage des biomolécules au  $^{18}\text{F}$  de manière indirecte<sup>8</sup>.

##### 2.4.2.1 Approche prosthétique

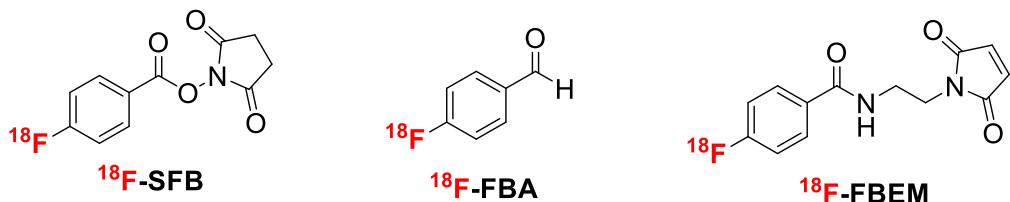
Elle consiste à insérer des petites molécules réactives (groupement prosthétique) radiomarquées à des biomolécules dans des conditions douces (**Schéma 13**)<sup>37</sup>. Le groupement prosthétique est une molécule bifonctionnelle dont l'une des fonctions peut

servir à l'insertion du  $^{18}\text{F}$  et l'autre à la fixation sur la biomolécule par conjugaison grâce aux sites actifs (fonction amine, thiol,...) de cette biomolécule<sup>13</sup>.



**Schéma 13:** marquage par approche prosthétique des biomolécules<sup>30</sup>.

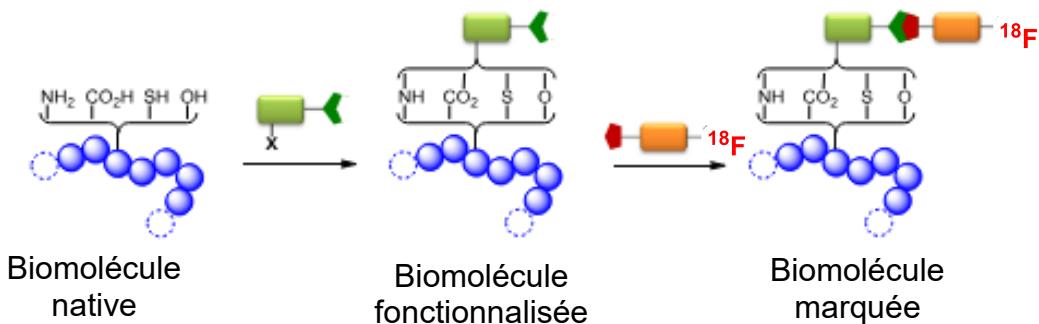
L'approche prosthétique est la méthode de choix utilisée de nos jours pour le marquage des biomolécules car elle permet de surmonter les conditions de marquages difficiles des biomolécules<sup>30</sup>. De nombreux groupements prosthétiques ont été développés pour le marquage des biomolécules (**Figure 8**), c'est le cas du  $^{18}\text{F}$ -FBA, qui forme un conjugué via la formation d'oxime avec la fonction amine du peptide. Le N-succinimidyl (exemple,  $^{18}\text{F}$ -SFB) et le maléimide (exemple, le  $^{18}\text{F}$ -FBEM peuvent se conjuguer respectivement avec les fonctions amine et thiol des biomolécules<sup>38</sup>.



**Figure 8:** Quelques groupements prosthétiques<sup>8</sup>.

#### 2.4.2.2 Chimie bioorthogonale

Le terme chimie bioorthogonale a été inventé par Carolyn Bertozzi au début du 21<sup>ème</sup> siècle<sup>39</sup>. Elle désigne l'ensemble des réactions chimiques se produisant dans les tissus vivants sans interagir avec le système biologique. Du fait de leur cinétique rapide, leur haute sélectivité, elles peuvent se dérouler en milieu biologique et permettre ainsi l'étude des différents processus biologiques<sup>8</sup>. Les réactions bioorthogonales se déroulent en deux étapes (**Schéma 14**): dans un premier temps, le couplage de la biomolécule avec le groupement prosthétique pour former la biomolécule fonctionnalisée, suivi d'une réaction avec un réactif capable d'être sélectif *in vivo*<sup>40</sup>.



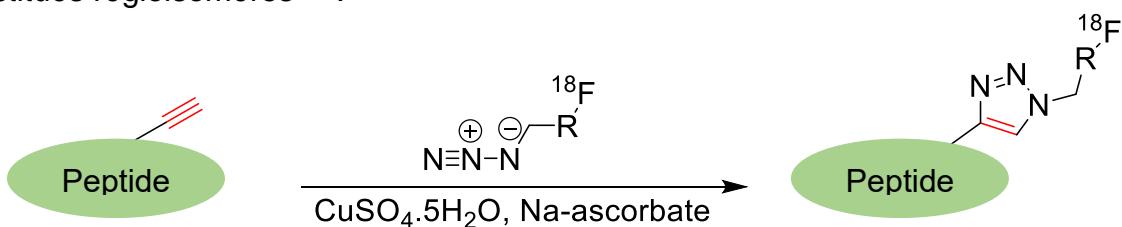
**Schéma 14:** Etapes de marquage d'une molécule par réactions bioorthogonales<sup>40</sup>.

#### 2.4.2.3 Chimie click

La chimie click est une chimie qui étudie des réactions au cours de laquelle deux substrats peuvent réagir sélectivement l'un avec l'autre dans un temps suffisamment court et dans les conditions douces<sup>41</sup>. Elle permet d'effectuer des réactions complexes qui peuvent avoir lieu *in vivo* et ainsi être utilisées par des biologistes. La complexité des réactions de chimie click réside sur le choix des paramètres tels que la vitesse de réaction, la stoechiométrie, la réduction des étapes de purification, la concentration et la concentration de la biomolécule nécessaire pour l'obtention d'un bon rendement radiochimiques<sup>27</sup>. La maîtrise de ces paramètres permet de faire de la chimie click, la méthode de choix par excellence pour la construction de radiotraceurs<sup>37,40</sup>. Les réactions de chimie click permettent ainsi de surmonter les difficultés rencontrées lors de l'insertion de l'ion fluorure <sup>18</sup>F par substitution nucléophile sur les biomolécules. La cycloaddition azide-alcyne catalysée par le cuivre (I) (**Schéma 15**), la cycloaddition alcyne-azide favorisée par la contrainte (**Schéma 16**), et la liaison à la tétrazine (**Schéma 17**), représentent d'excellents exemples de réactions de chimie click du fait de leur chimiosélectivité de bioconjugaison<sup>29</sup>.

##### 2.4.2.3.1 Cycloaddition azide-alcyne catalysée par le cuivre (I)

Encore appelée cycloaddition de Huisgen, il s'agit d'une réaction à cinq chaînons entre un azoture et un alcyne acyclique afin d'obtenir un 1,2,3 - triazole. Elle nécessite un long temps de chauffage pour surmonter la barrière d'activation du cycle à chaînons et une conversion totale du produit. Les produits obtenus sont généralement des triazoles 1,4-substitués régioisomères<sup>8,42</sup>.

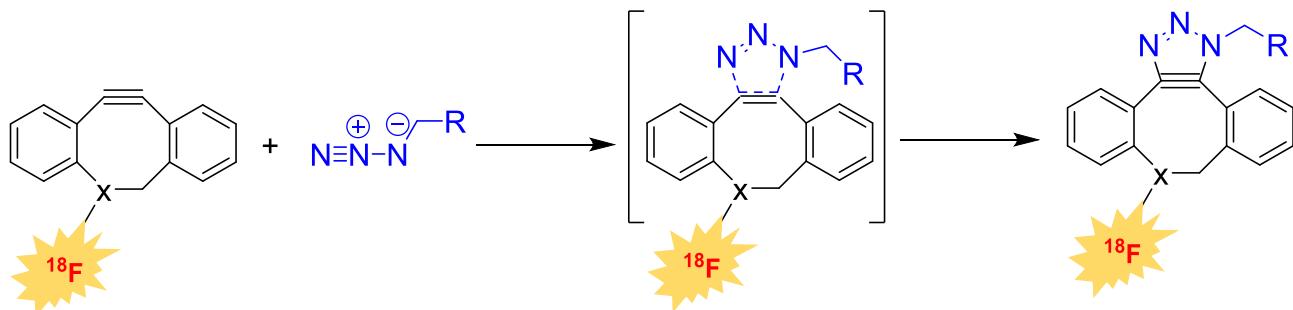


**Schéma 15:** Exemple de cycloaddition azide-alcyne catalysée par le cuivre (I)<sup>8</sup>.

Elle nécessite l'utilisation de grandes quantités de cuivre (I) comme catalyseur. Le cuivre étant connu pour sa toxicité, cela constitue ainsi l'un des problèmes de la CuAAC<sup>27</sup>. La résolution de ce problème pour les systèmes biologiques, a permis la mise sur pied de la cycloaddition alcyne-azide favorisée par la contrainte qui a la particularité de s'effectuer sans catalyseur.

#### 2.4.2.3.2 Cycloaddition alcyne-azide favorisée par la contrainte

C'est une cycloaddition de formation d'un triazole sans intervention du catalyseur Cu(I). Elle s'effectue entre un azide et la triple liaison courbée du cyclooctyne. La géométrie courbe du cyclooctyne diminue significativement la barrière d'activation de la réaction et ainsi augmente la vitesse de la réaction<sup>42</sup>.



**Schéma 16:** Mécanisme de cycloaddition alcyne-azide favorisée par la contrainte (SPAAC)<sup>8</sup>.

Généralement deux approches sont envisagées pour le radiomarquage des biomolécules; la première où le radiomarquage est sur la fraction du cyclooctyne et la seconde où le radiomarquage est sur l'azide<sup>43</sup>. La constante de vitesse des réactions des cyclooctynes est faible, et augmente avec l'introduction des groupements attracteurs d'électrons sur des positions proches de l'alcyne<sup>44</sup>. L'inconvénient majeur de la SPAAC est le caractère hydrophobe du réactif cycloalcyne à cycle contraint et le produit de la liaison par click, qui peut perturber la radiosynthèse et ainsi les profils pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des produits radiopharmaceutiques<sup>45</sup>.

#### 2.4.2.3.3 La liaison à la tétrazine

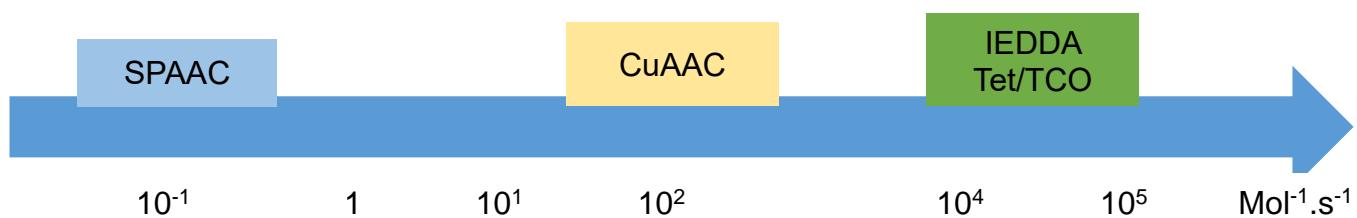
Basée sur la réaction de Diels-Alder à demande inverse d'électrons, il s'agit d'une réaction de cycloaddition bioorthogonale [4+2] entre des fractions de s-tétrazine et trans-cyclooctène (TCO). Elle donne en fonction du diénophile alcyne ou alcène des pyradazines ou des dihydropyradazines.



**Schéma 17:** Schéma général de la liaison à la tétrazine<sup>46</sup>.

La liaison à la tétrazine basée sur la réaction de Diels-Alder à demande électronique inverse est caractérisée par une vitesse de réaction très rapide ( $\sim 10^5 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ ) et donc permet à de faibles concentrations la modification de la biomolécule par bioconjugaison rapide<sup>47</sup>. Elle possède de nombreux avantages à savoir sa faisabilité dans différents solvants (solvants organiques, eau, milieu cellulaire...), l'incorporation du fluor-18 peut se faire par voies directes ou indirectes (utilisations des groupements prosthétiques), le rendement de la réaction est très élevé (~98%) et elle nécessite de très petites quantités de réactifs (~21 $\mu\text{M}$ ). De ce fait, cette méthode semble la plus prometteuse en terme de réactions click<sup>48</sup>.

La constante de vitesse élevée (**Schéma 18**) de ces différentes réactions permet leurs utilisations pour le pré ciblage *in vivo* des stratégies de marquages.

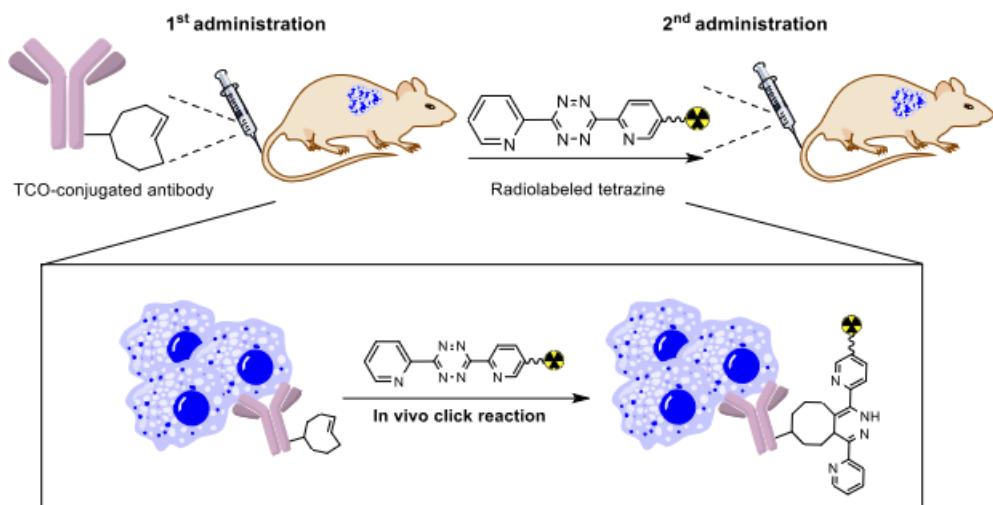


**Schéma 18:** Constante de vitesse des différentes réactions click pour le radiomarquage des biomolécules<sup>39</sup>.

#### 2.4.2.4 Préciblage

Il est principalement utilisé pour surmonter l'inconvénient de l'utilisation d'anticorps radiomarqués. Il s'agit de leur élimination lente dans le sang<sup>42</sup>. Les stratégies de préciblage sont généralement utilisées pour les biomolécules possédant une faible pharmacodistribution. Les biomolécules de types anticorps possédant une pharmacodistribution élevée, leur marqueage au fluor-18 est impossible du fait de la courte demi-vie de ce dernier. Ainsi pour contourner cette difficulté, deux approches sont généralement utilisées: d'une part on peut utiliser des radiométaux ayant une longue durée de vie comme le Zirconium-89 qui est un émetteur de positons ( $t_{1/2}=3,2\text{jours}$ )<sup>30</sup>. D'autre part on peut effectuer le préciblage en deux phases (**Schéma 19**). Premièrement on injecte un agent primaire qui s'accumule pendant quelques jours dans le tissu tout en étant éliminé de la circulation sanguine: c'est l'anticorps modifié avec un TCO. Ensuite on administre un

agent secondaire qui est une petite molécule radiomarquée ayant un profil pharmacocinétique rapide. La mise en commun des agents entraîne une accumulation du radionucléide dans le tissu visé. L'élimination rapide de l'agent secondaire permet l'obtention des rapports élevés entre la tumeur/bruit de fond et ceci beaucoup plus tôt qu'avec des anticorps directement radiomarqués<sup>42</sup>.



**Schéma 19:** Stratégie générale pour l'imagerie et la thérapie pré-ciblées<sup>41</sup>.

Du fait de la cinétique rapide et des très faibles concentrations utilisées, l'IEDDA est l'un des outils les plus puissants parmi les approches de chimie click pour le préciblage. Robillard et *al.* ont ainsi utilisé la liaison IEDDA et rapporté leur travail sur l'imagerie pré-ciblée *in vivo* de cancers en 2010. En effet, dans un premier temps, le ciblage des cellules cancéreuses du colon de souris s'est fait par l'injection du groupe TCO portant l'anticorps CC49. 24h après l'administration de l'anticorps, une petite quantité de traceur tétrazine marqué à In-111 a été injecté dans le même modèle de souris. Les images obtenus ce sont révélées significatives face à l'insertion du radio-isotope dans la tumeur<sup>41</sup>.

## 2.5 But et objectifs du mémoire

Le radiomarquage des biomolécules par les nucléides émetteurs de positrons a considérablement évolué au cours des deux dernières décennies. L'utilisation de ces biomolécules (protéines, anticorps, peptides) dans l'imagerie moléculaire ciblée est de plus en plus sollicitée. De ce fait, elles doivent être liées à un radionucléide (généralement le fluor-18 est le plus approprié) incorporer grâce à l'utilisation des groupes prosthétiques<sup>49</sup>. Cependant, malgré la large gamme de groupements prosthétiques qui a été développée, ces derniers ont été synthétisés après plusieurs étapes de marquage, diminuant ainsi le rendement de marquage et la réactivité. C'est le cas par exemple du  $[^{18}\text{F}]$ FSB (Schéma

20), du  $[^{18}\text{F}]$ FBEM (Schéma 21), qui sont des groupement prosthétiques connus pour marquer les protéines, les peptides dans l'organisme<sup>50</sup>.

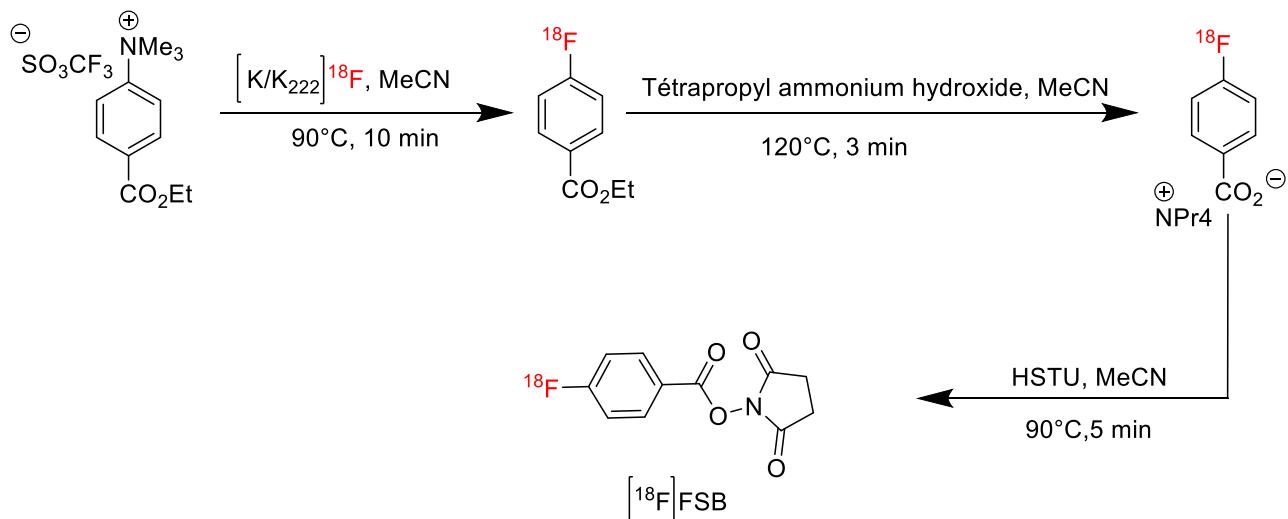


Schéma 20: Schéma de synthèse du  $[^{18}\text{F}]$ FSB d'après Tang et al<sup>49</sup>.

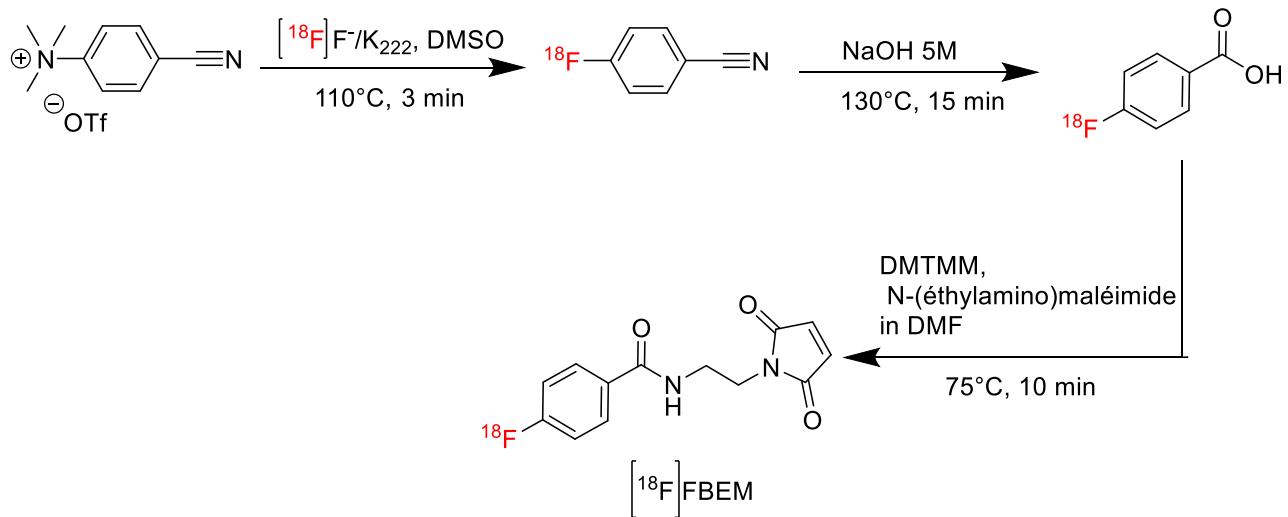
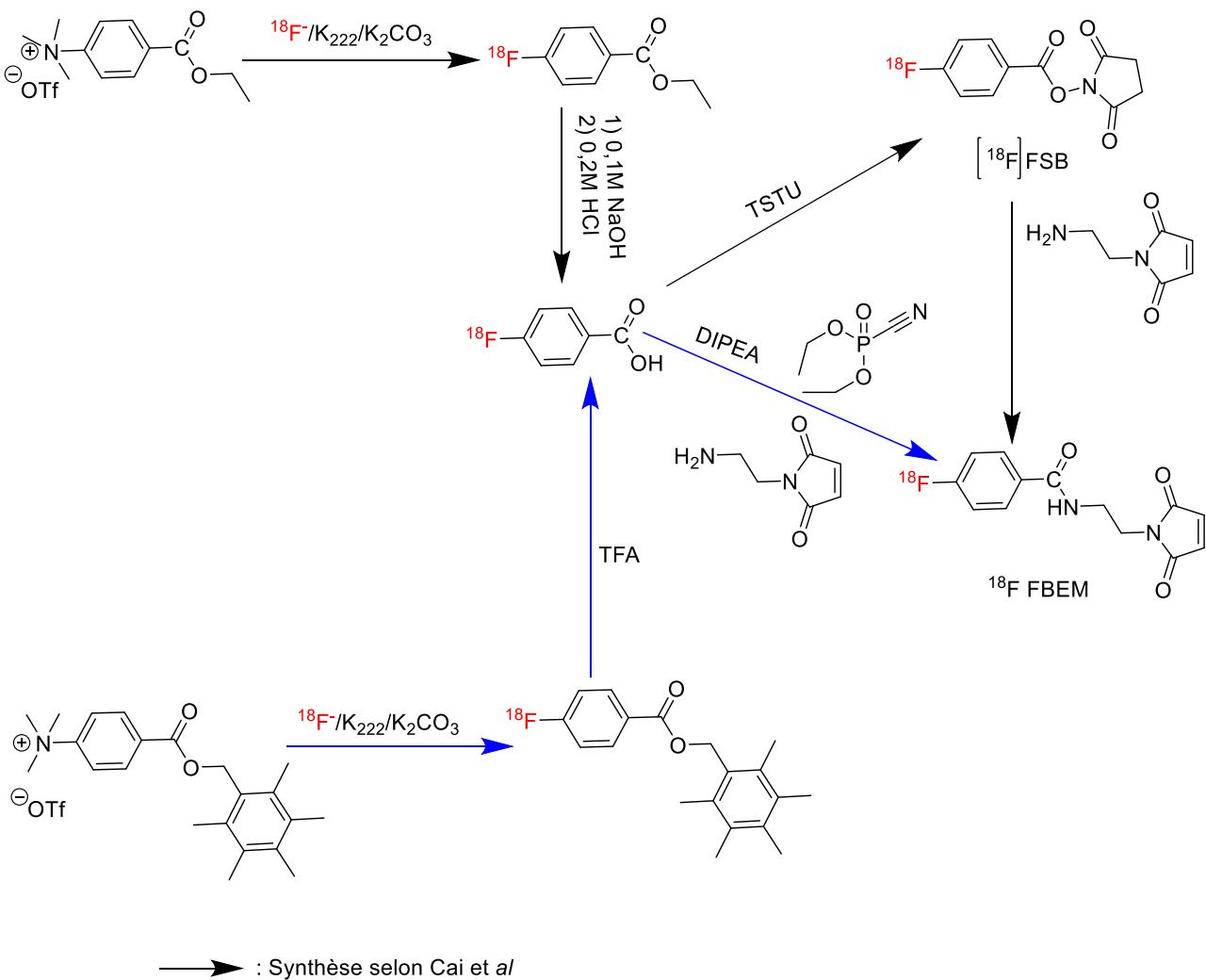


Schéma 21: Schéma de synthèse du  $[^{18}\text{F}]$ FBEM d'après Lacroix et al<sup>51</sup>.

De nombreux chercheurs à l'instar de David et al, Cai et al, Dale et al ont pu synthétiser ces précurseurs (Schéma 22), mais à chaque fois en plusieurs étapes de marquages et donnant ainsi de longues durées de synthèses, des rejets d'activité et parfois de faibles rendements de synthèses<sup>51-53</sup>. Il est donc essentiel de développer de nouvelles voies de synthèse, plus rapides et plus efficaces, afin de doter le corps médical d'une boîte à outils la plus complète possible de composés radiopharmaceutiques utilisables pour la compréhension et le traitement des maladies.



→ : Synthèse selon Cai et al/

→ : Synthèse selon Dale et al/

**Schéma 22:** Schéma de synthèse du  $[^{18}\text{F}]$ FBEM d'après Lacroix et al<sup>52,54</sup>.

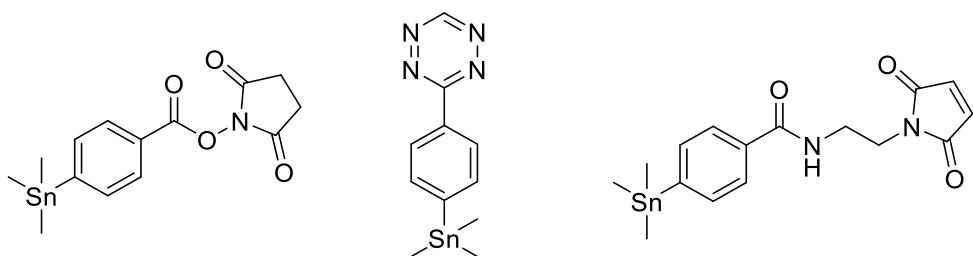
Le but de ce travail consiste à développer une boîte à outils permettant de marquer des biomolécules à la fois via des fonctions déjà présente sur celles-ci (FBEM et SFB) et un outil de préciblage avec la tétrazine. La particularité de ces composés réside sur le fait qu'ils seront obtenus en une étape de marquage et ils permettront des applications en imagerie médicale ou en thérapie, cela pour des diagnostics et des traitements ciblés. Il s'agira spécifiquement:

⇒ En synthèse chimique:

- ✚ Synthétiser le précurseur du  $[^{18}\text{F}]$ FSB stannylés dans le but de faire un marquage en une étape.
- ✚ Synthétiser le précurseur du  $[^{18}\text{F}]$ FBEM stannylés dans le but de faire un marquage en une étape.

- ⊕ Synthétiser le précurseur stannylé du 3-[F18]parafluorophényl)-1,2,4,5,-tétrazine dans le but de faire un marquage en une étape.  
⇒ En radiomarquage:
- ⊕ Effectuer le radiomarquage des différents précurseurs synthétisés (**Figure 9**) afin d'obtenir les groupements prosthétiques correspondant.
- ⊕ Evaluer les performances des groupes prosthétiques en termes de captation efficace des isotopes radioactifs,

La particularité de ces composés à synthétiser réside sur la méthode de radiomarquage s'effectuant en une seule étape. Il sera ainsi question de synthétiser les précurseurs stannylés (**Figure 9**).



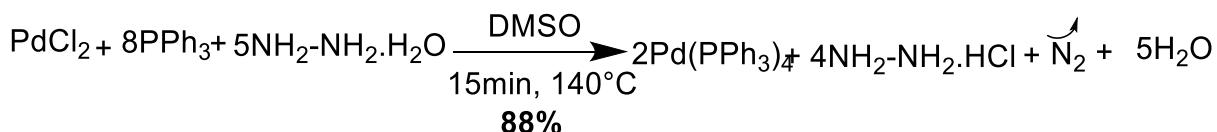
**Figure 9:** Quelques précurseurs stannylés

### **3 RESULTATS ET DISCUSSIONS**

Les réactions de stanylation de plusieurs composés nécessitant l'utilisation du catalyseur  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ , la première étape a été sa synthèse dans le but d'éviter toute interprétation faussée à cause de sa pureté, car celui vendu commercialement était déjà dégradé à l'achat.

### 3.1 Synthèse du catalyseur tétrakis (triphenylphosphine) palladium (0)

La synthèse du catalyseur tétrakis (triphenylphosphine) palladium (0) s'est faite suivant deux voies, d'une part en partant du chlorure de palladium (**Schéma 23**) et d'autre part en partant de l'acétate de palladium (**Schéma 24**).



**Schéma 23:** Synthèse du complexe tétrakis (palladium) via l'hydrazine

#### Discussion:

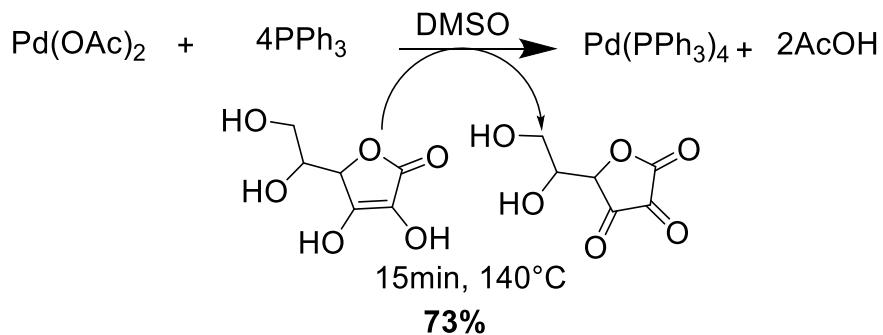
La synthèse du catalyseur tétrakis s'est faite dans un premier temps par addition du chlorure de palladium (1Eq), de la triphénylphosphine (4,81 Eq) dans du DMSO (25 mL), puis l'ajout de l'hydrazine (3,87 Eq). Le rendement de **88%** obtenu peut se justifier par le fait que le  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  est un composé instable et peut se décomposer en  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_3$ ,  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2$  d'une part et s'oxyder assez facilement à l'air d'autre part ; ce qui s'explique par les taches obtenues sur la plaque CCM (**voir figure 10**) immédiatement après séchage<sup>55,56</sup>. La dénaturation du catalyseur s'est faite dans les minutes qui suivaient. La coloration du produit obtenu (**Figure 1**) n'étant pas exactement celle qu'on attendait, une autre méthode de synthèse a été proposée afin d'obtenir la coloration souhaitée du catalyseur (**Figure 12**).



**Figure 10:** Plaque CCM du palladium tétrakis.



**Figure 11:** Palladium tétrakis obtenu avec le  $\text{PdCl}_2$



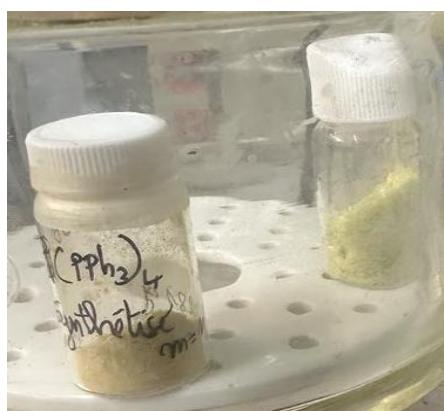
**Schéma 24:** Synthèse du complexe tétrakis (palladium) via l'acide ascorbique



**Figure 12:** Palladium tétrakis obtenu avec le  $\text{Pd(OAc)}_2$

### Discussion:

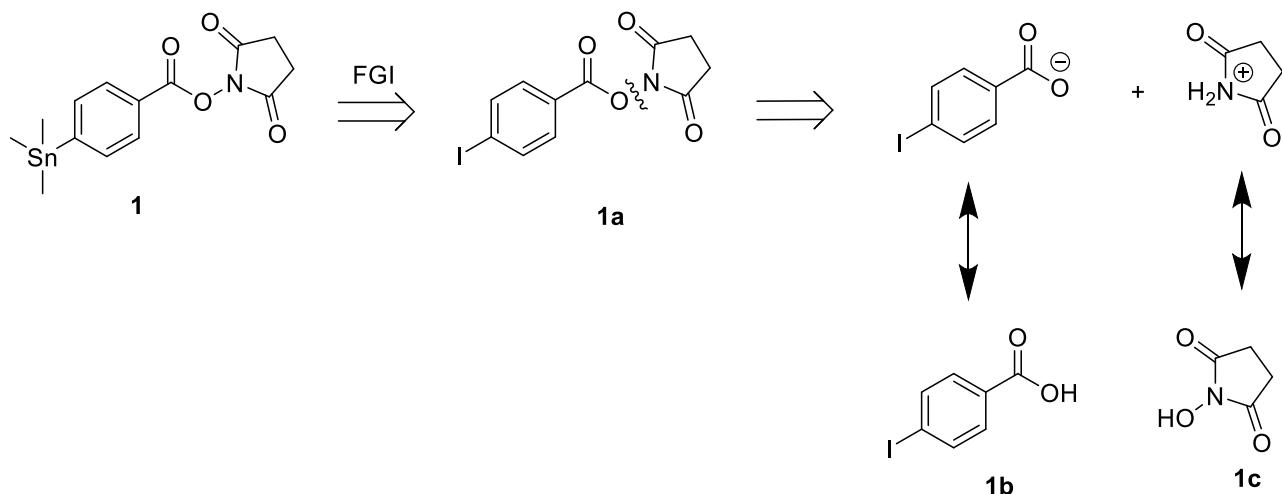
La synthèse du catalyseur tétrakis selon procédé s'est faite par addition de l'acétate de palladium (1Eq), de la triphénylphosphine (5 Eq) dans du DMSO (25 mL), puis l'ajout de l'acide ascorbique (4 Eq). Nous avons obtenu un rendement de **73%**<sup>57</sup>. Cela peut se justifier par le fait que le  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  a été obtenu après une filtration à chaud et donc il y avait encore du catalyseur soluble dans le solvant, cependant l'aspect physique était beaucoup plus intéressant. Il existe une différence de coloration (**Figure 13**) entre les deux catalyseurs obtenus tout simplement du fait de la filtration. La filtration s'est faite à température ambiante lors de l'usage du  $\text{PdCl}_2$ , tandis qu'elle s'est fait à chaud lors de l'usage du  $\text{Pd(OAc)}_2$ .



**Figure 13:** Palladium tétrakis obtenu avec le  $\text{PdCl}_2$  à gauche et celui obtenu avec le  $\text{Pd(OAc)}_2$  à droite.

## 3.2 Synthèse du N-succinimidyl - 4 - (triméthylstannylyl) benzoate

### 3.2.1 Analyse retrosynthétique du précurseur 1

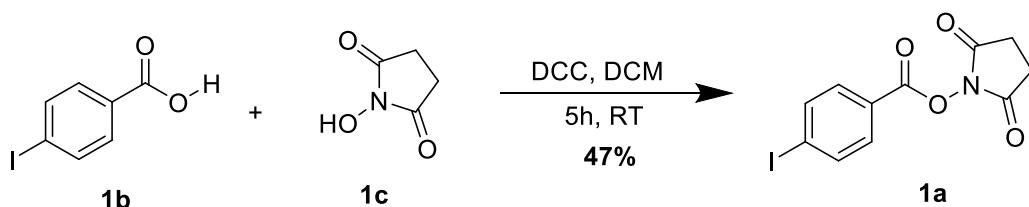


**Schéma 25:** Analyse retrosynthétique du précurseur 1

Le N-succinimidyl - 4 - (triméthylstannylyl) benzoate (**1**) est le précurseur du radiotraceur [<sup>18</sup>F]SFB. Le **schéma 25** montre l'analyse retrosynthétique du N-succinimidyl - 4 - (triméthylstannylyl) benzoate (**1**). Il peut être obtenu par réaction de formation de la liaison C-Sn par couplage au palladium à partir d'un dérivé halogéné (**1a**) et l'hexaméthyldiéthain. Le dérivé halogéné choisi est un dérivé iodé tout simplement parce que l'iode étant un atome volumineux, est très polarisable et constitue ainsi un bon groupement partant lors du couplage au palladium. Le dérivé halogéné n'étant pas disponible commercialement, il a été obtenu par réaction d'estérification entre un acide carboxylique (**1b**) et un alcool (**1c**) en présence d'un agent de couplage. La formation de l'ester constitue l'étape déterminante de la synthèse du précurseur car elle permet l'obtention du squelette de ce dernier (**1**). L'estérification étant une réaction lente, partielle, athermique, le choix de l'alcool est crucial pour obtenir un ester stable pour la suite des réactions. Ainsi le choix du N-hydroxysuccinimide (NHS) semble raisonnable car, estérifié il est stable dans les solvants organiques et peut être conservé pendant plusieurs mois sans se dégrader.

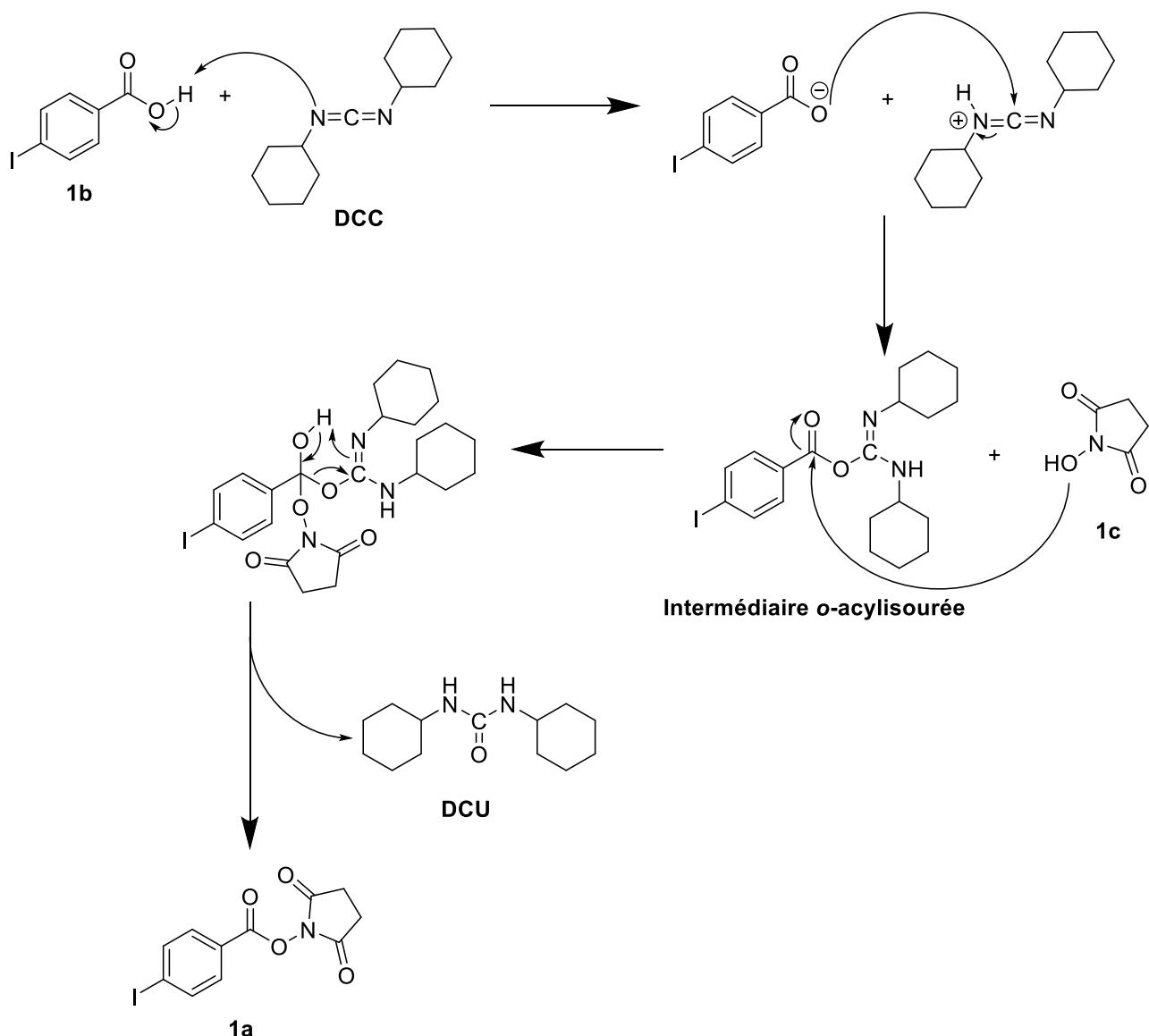
### 3.2.2 Synthèse du précurseur 1

#### Etape 1: Réaction d'estérification



**Schéma 26:** Synthèse du 4-iodobenzoate de succinimide.

## Mécanisme réactionnel



**Schéma 27:** Mécanisme réactionnel de l'estérification du 4-iodobenzoate de succinimide.

Le **schéma 27** illustre le mécanisme réactionnel du couplage de l'acide 4-iodobenzoïque avec le N, N'dicyclohexylcarbodiimide (DCC) pour former un intermédiaire *o*-acylisourée plus réactif que l'acide de départ et pouvant être attaqué par un nucléophile faible tel que le NHS. Il s'ensuit un réarrangement à 6 chainons avec libération du DCU, et conduisant à la formation de la molécule ciblée.

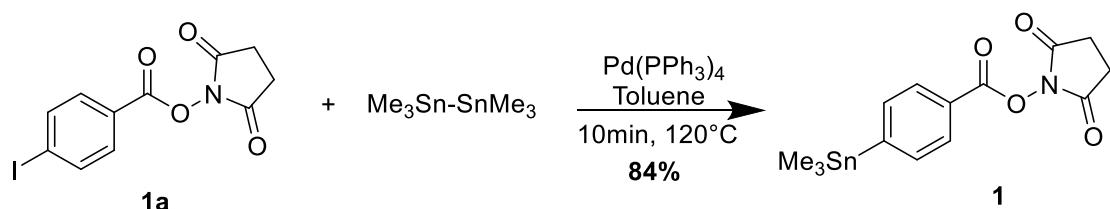
## Discussion

La réaction s'est déroulée dans des conditions douces. Elle était sensée durée toute la nuit, mais les suivis par CCM (**Figure 14**) et UPLC ont montré que la réaction s'est terminée après 5h afin d'obtenir des cristaux blanchâtres avec un rendement de **47%** sur une échelle de 4 grammes après purification par trituration dans le mélange EP: DCM (1:1).



**Figure 14:** Plaques CCM du suivi réactionnel de la synthèse du 4-iodobenzoate de succinimide avant (gauche) et après (droite) purification.

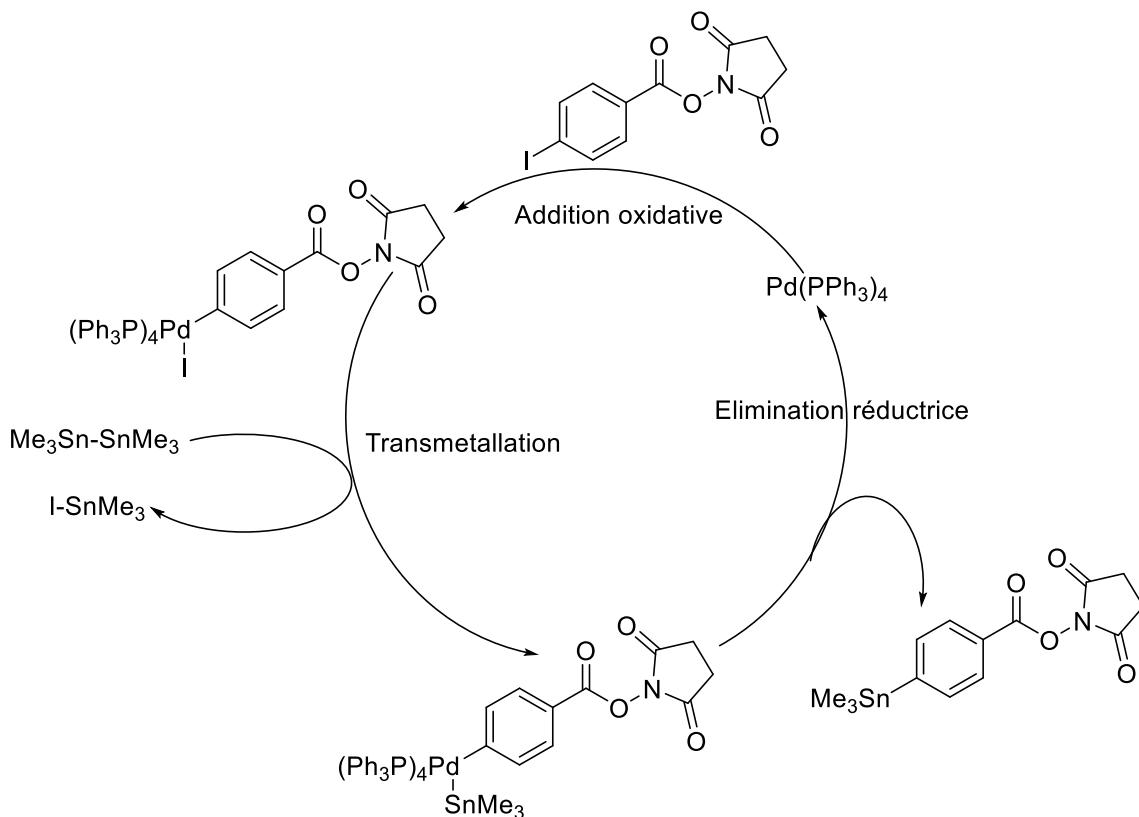
**Etape 2: Stannylation par couplage au palladium**



b) Synthèse du précurseur par Nagachinta et *a/* modifié

**Schéma 28:** Synthèse du 4-triméthylstannylbenzoate de succinimide<sup>50</sup>.

## Mécanisme réactionnel

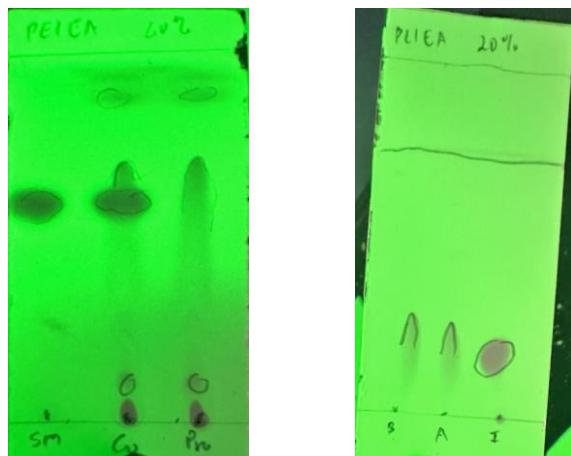


**Schéma 29:** Mécanisme réactionnel du couplage du 4-triméthylstannylnbenzoate de succinimide<sup>58</sup>.

Dans un premier temps, le catalyseur réagit avec le dérivé halogéné par addition oxidative où, il s'insère entre l'halogène et le substrat, s'ensuit une transmétallation par ajout de l'hexadiméthylétain par échange entre l'halogène et le triméthylstannyln et enfin par élimination réductrice il y a formation du composé 1.

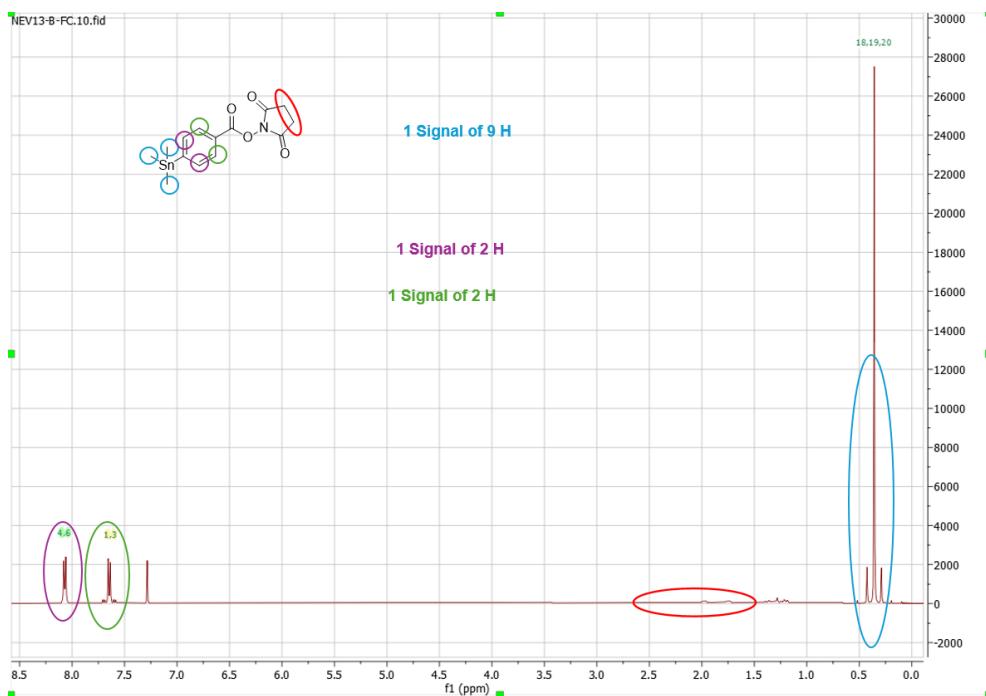
## Discussion

La réaction de synthèse du précurseur 1 est une réaction qui dure environ 24h<sup>50</sup>. La clé de cette réaction réside au niveau de la quantité d'hexaméthyldiéthain utilisé ; en effet une quantité en défaut permettra la formation de produits secondaires par couplage de Stille entre le produit formé (le produit stannylé) et le réactif de départ (l'ester halogéné) dans le but d'obtenir un dimère. La synthèse du précurseur 1 a été réalisé dans un premier temps en suivant les indications de Nagachinta et *al*, l'analyse par CCM a révélé que le produit obtenu éluait avec des trainées sur la plaque. Par la suite une CCM (**Figure 15**) a été faite entre la référence du précurseur 1 et le précurseur synthétisé dans le but de comparer les temps de rétentions. Il a été constaté que les temps de rétention étaient presque identiques mais la différence se trouvait au niveau de la trainée, ce qui nous a fait douter sur la nature du produit obtenu.



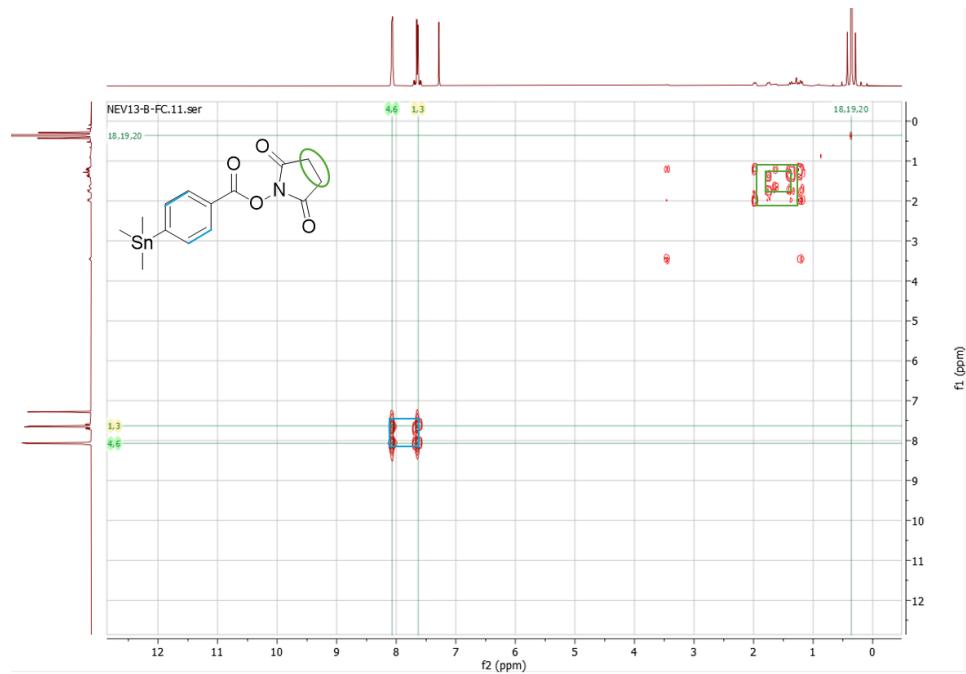
**Figure 15:** Plaque CCM du produit dégradé obtenu après stannylation.

Par la suite une comparaison par UPLC a été faite entre la référence du précurseur **1** préalablement synthétisé au laboratoire et le précurseur synthétisé afin de vérifier les temps de rétention et les différentes masses ; elle a permis de soupçonner que le produit identifié n'était pas le produit désiré. De plus l'analyse RMN  $^1\text{H}$  (**Figure 16**) du produit obtenu a révélé la présence de 3 signaux de 13 protons dont 1 signal de 9 protons entre 0-1 ppm attribuables aux protons des méthyles stannylés, et 2 signaux de 4 protons aux environs de 7 ppm attribuables aux protons aromatiques du benzoate, mais n'a pas révélé la présence d'un signal de 4 protons entre 2-4 ppm attribuables aux protons de la partie succinimidique.



**Figure 16:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  de l'acide 4-triméthylstannylnbenzoïque.

Enfin le spectre COSY (Figure 17) a confirmé le couplage entre les protons aromatiques mais n'a pas révélé le couplage entre les protons succinimidiques. Une explication probable a été une potentielle hydrolyse qui a dégradé le produit et donner l'acide 4-triméthylstannylbenzoïque.

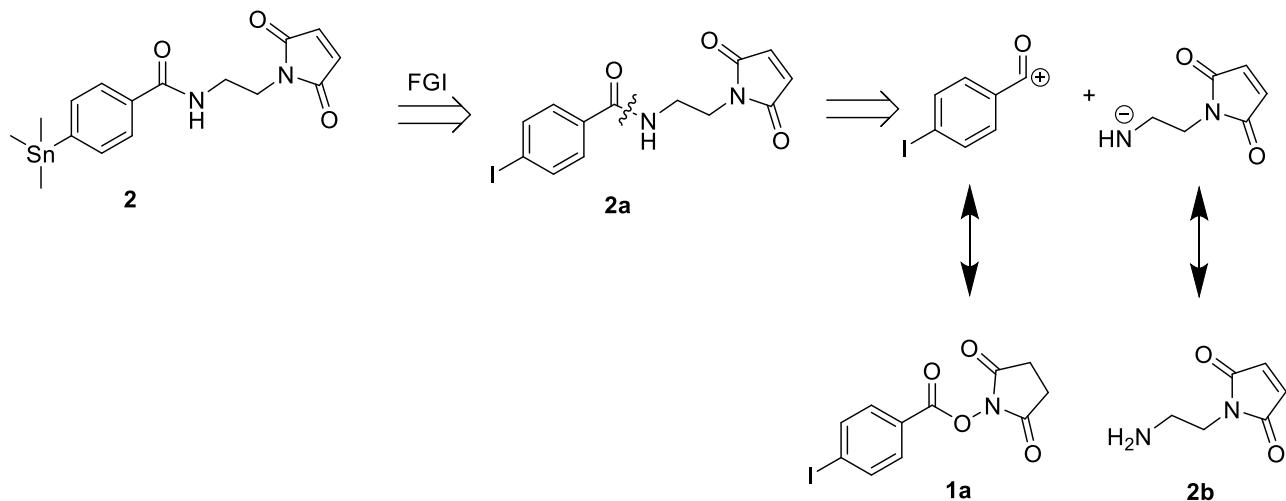


**Figure 17:** Spectre RM COSY de l'acide 4-triméthylstannylbenzoïque.

Cette dégradation a pu être due au fait du chauffage à haute température pendant longtemps du produit qui a dégradé le succinimide. L'expérience a été reprise dans les mêmes conditions excepté la durée de la réaction qui a été modifiée car cette dernière a été suivie par CCM et par UPLC après chaque 5min. Il a été constaté que la réaction s'est terminée après 10 min (lorsque la solution est devenue sombre). Ainsi le précurseur **1** a été obtenue comme une poudre beige avec un rendement de **84%** sur une échelle de 0.55 gramme après purification par chromatographie sur colonne dans le mélange EP: AE (7:3) en effectuant un dépôt solide sur gel de silice.

### 3.3 Synthèse du N-(2-maléimidoéthylamine) paratriméthylstannylyl benzylamide

#### 3.3.1 Analyse retrosynthétique du précurseur 2

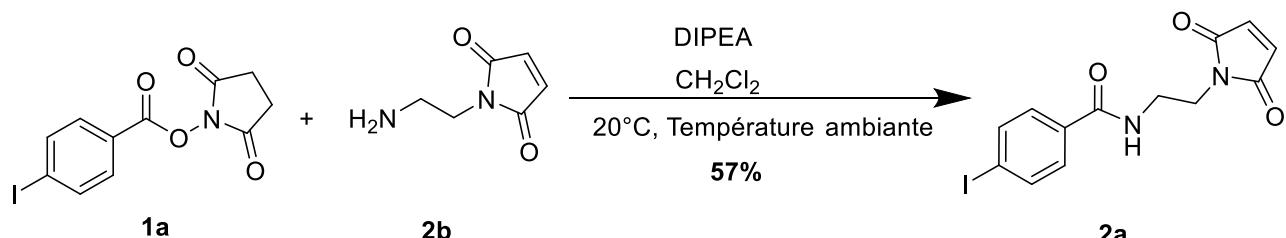


**Schéma 30:** Analyse retrosynthétique du précurseur 2.

Le N-(2-maléimidoéthylamine) paratriméthylstannylyl (2) est le précurseur du radiotraceur  $[^{18}\text{F}]$ FBEM. Le schéma 30 présente la retrosynthèse du N-(2-maléimidoéthylamine) paratriméthylstannylyl (3). Ce précurseur peut être obtenu par réaction de formation de la liaison C-Sn par couplage au palladium à partir de l'hexaméthyldiéthain et d'un dérivé halogéné (2a). Ce dernier n'étant pas disponible commercialement, il a été obtenu par réaction entre un ester (1a) et une amine (2b) en présence d'une base dans des conditions douces.

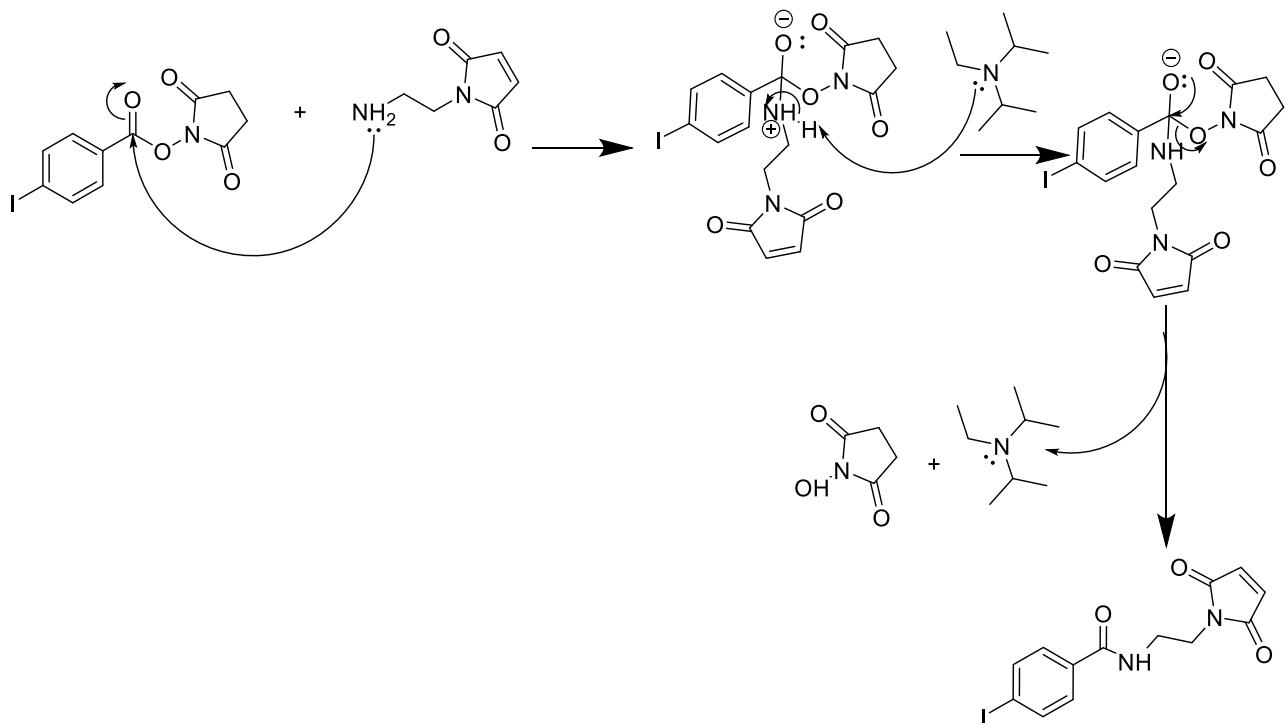
#### 3.3.2 Synthèse du précurseur 2

##### Etape 1: Formation de l'amide inspirée de la réaction de Schotten-Baumann.



**Schéma 31:** Synthèse du N-(2-maléimidoéthylamine) paraiodobenzylamide.

## Mécanisme réactionnel

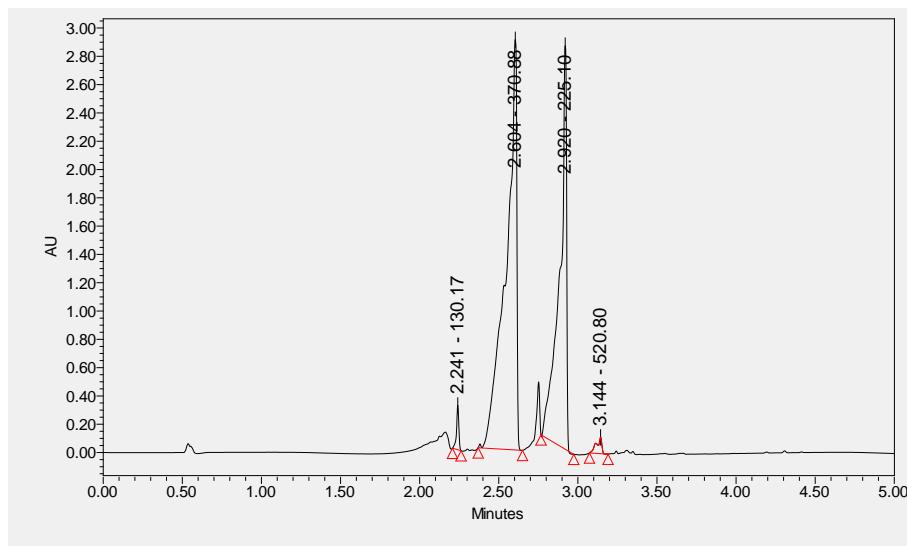


**Schéma 32:** Mécanisme de formation du N-(2-maléimidoéthylamine) paraiodobenzylamide.

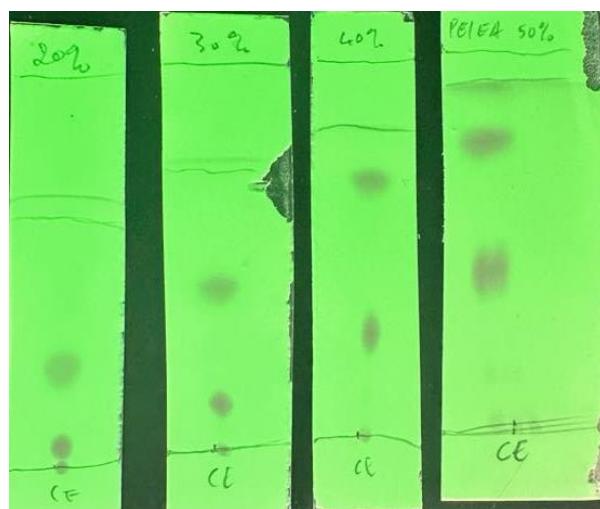
Le **schéma 32** décrit la formation d'une amide par réaction de substitution nucléophile sur  $C_{sp^2}$  entre une amine primaire et un ester réactif. Par la suite il y a ajout d'une base faible telle que la DIPEA pour neutraliser les protons environnants afin de maintenir les conditions favorables dans le milieu réactionnel. Il s'ensuit une formation du produit ciblé en libérant le NHS et en régénérant la base de départ.

## Discussion

La réaction a été faite dans un premier temps à basse échelle pour tester les conditions réactionnelles. Dans le but d'éviter une colonne chromatographie vu la petite échelle, la purification s'est ainsi faite par recristallisation à deux solvants à savoir le chloroforme et le n-heptane, mais le produit obtenu n'étant pas pur, nous avons décidé de refaire la réaction sur grande échelle afin d'augmenter les quantités. Elle a été suivi par CCM et par UPLC (**Figure 18**), elle s'est terminée au bout de 20h et nous avons pu obtenir une poudre blanchâtre avec un rendement de **57%** sur une échelle de 0,5 gramme après purification par chromatographie sur colonne dans le mélange EP: AE (7:3) en effectuant un dépôt solide sur gel de silice. Le choix du système d'élution n'étant pas favorable, de nombreuses CCM (**Figure 19**) ont été faites afin de sélectionner le meilleur système d'élution.

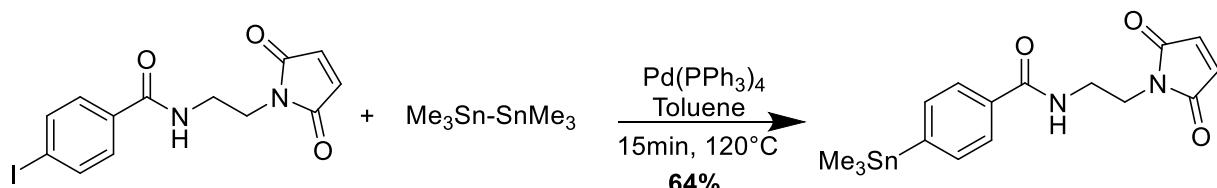


**Figure 18:** Suivi uplc de la synthèse du N-(2-maléimidoéthylamine) paraiodobenzylamide.



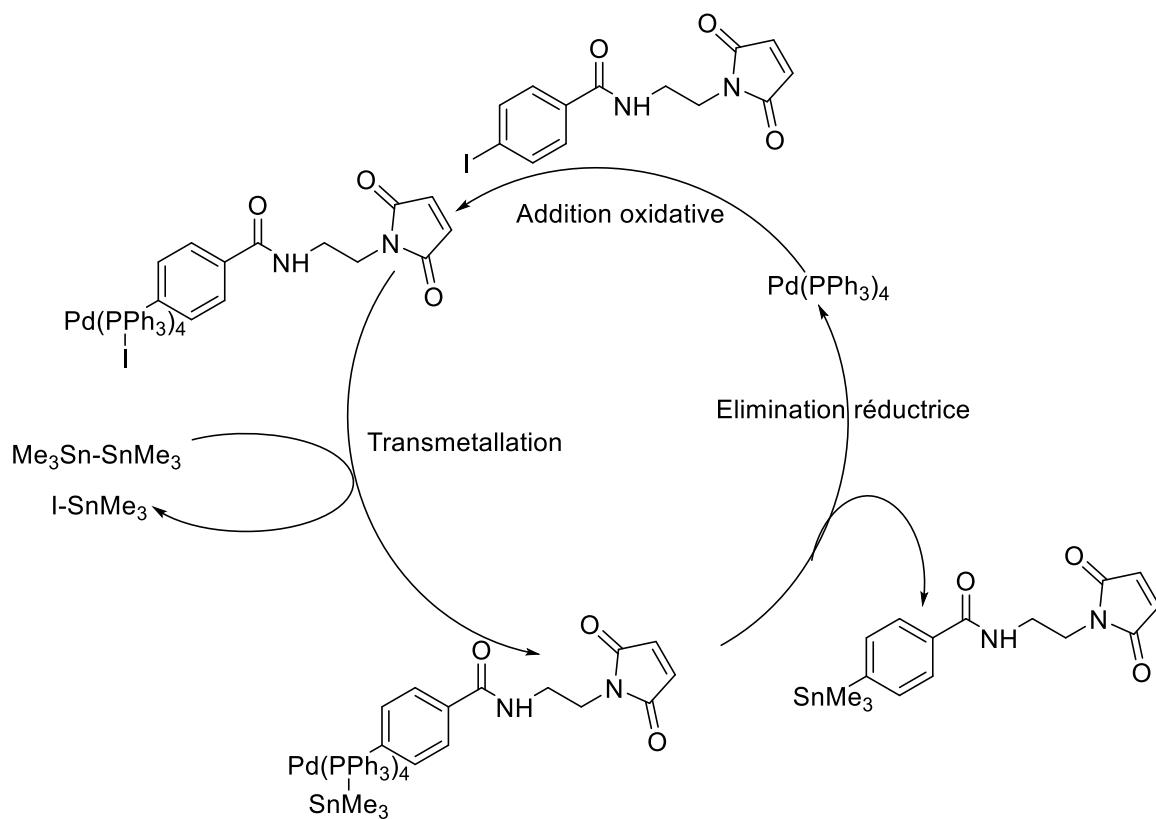
**Figure 19:** Sélection du système d'élution pour purification du N-(2-maléimidoéthylamine) paraiodobenzylamide.

### Etape 2: Réaction de couplage au palladium



**Schéma 33:** Synthèse du N-(2-maléimidoéthylamine) paratriméthylstannylbenzylamide.

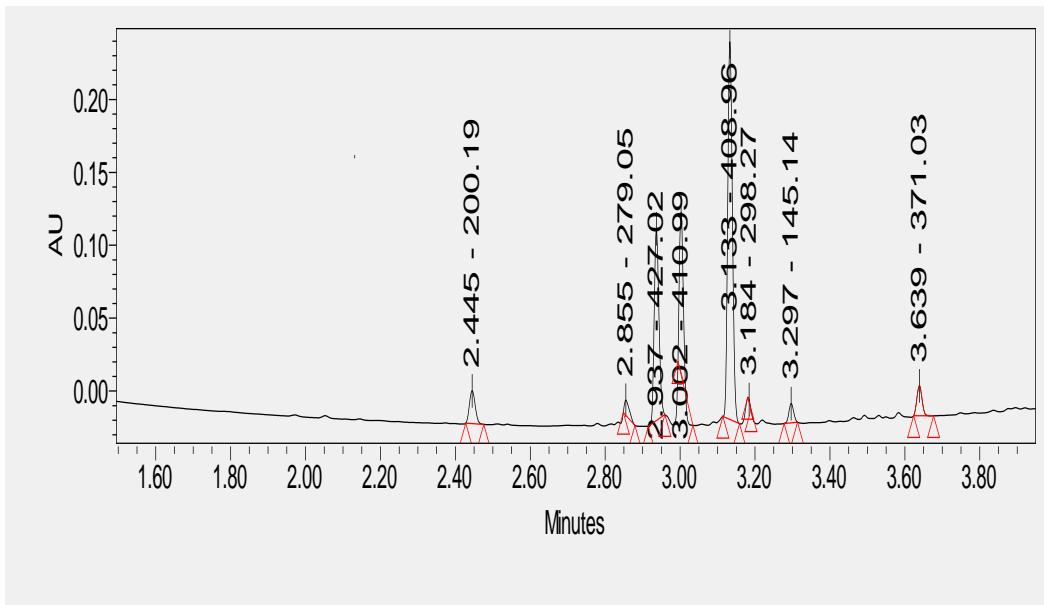
## Mécanisme réactionnel



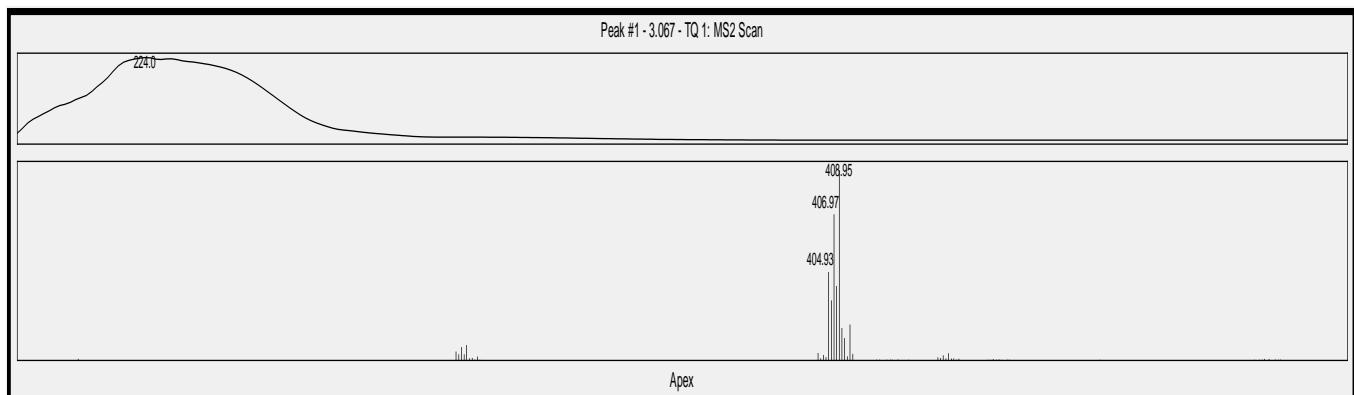
**Schéma 34:** Mécanisme réactionnel de formation du N-(2-maléimidoéthylamine) paratriméthylstannylbenzylamide<sup>58</sup>.

## Discussion

Le rendement de la réaction a été de **64%** sur une échelle de 0,2 gramme après purification par chromatographie sur colonne dans le mélange EP: AE (6:4) en effectuant un dépôt solide sur gel de silice. Néanmoins, ce rendement pourrait être amélioré car de nombreux solvants ont été utilisés afin de tester la solubilité totale ou partielle du produit pour effectuer une purification par chromatographie sur colonne. La réaction a été suivie par CCM et UPLC-MS (**Figure 20 et 21**) et s'est terminée au bout de 15 minutes et un solide jaunâtre a pu être obtenu. Il a été difficile de dissoudre complètement le produit obtenu avant purification lorsqu'il avait déjà refroidi. Malgré l'utilisation de nombreux solvants et systèmes de solvants systèmes. Ceci pourrait s'expliquer par la présence du groupe –SnMe<sub>3</sub> qui modifie la masse molaire et peut ainsi influencer la solubilité.



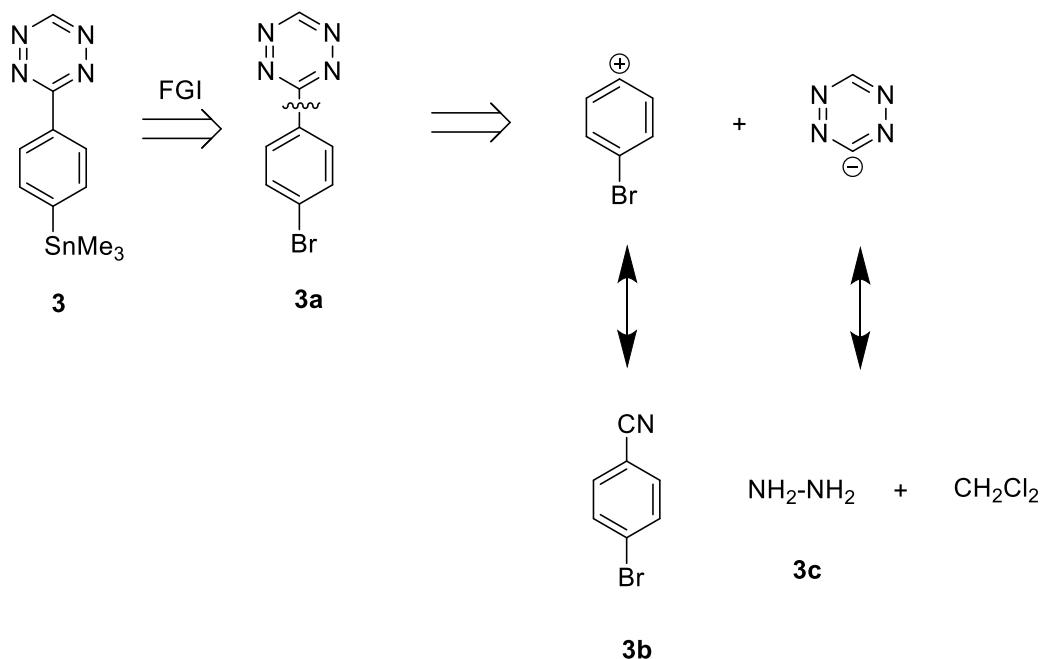
**Figure 20:** Suivi UPLC de la formation du N-(2-maléimidoéthylamine) paratriméthylstannylobenzylamide.



**Figure 21:** Spectre de masse du N-(2-maléimidoéthylamine) paratriméthylstannylobenzylamide.

### 3.4 Synthèse du 3-phényl (4'- triméthylstannylyl) -1,2,4,5- tétrazine

#### 3.4.1 Analyse retrosynthétique du précurseur 3

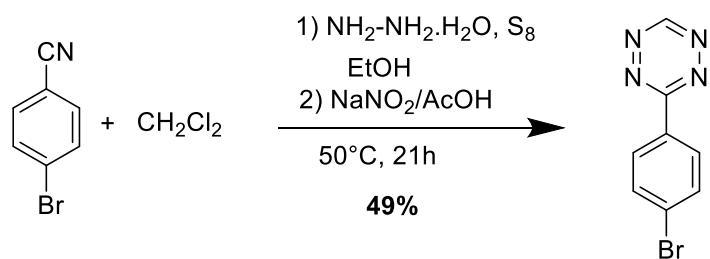


**Schéma 35:** Analyse retrosynthétique du précurseur 3.

Le précurseur 2 est obtenue par couplage au palladium du 3-phényl (4'-bromo) -1,2,4,5-tétrazine. Ce dernier n'étant pas commercial, il a été synthétisé à partir du bromobenzène en présence de l'hydrazine dans une série de réactions de substitutions nucléophiles, d'élimination et cyclisation.

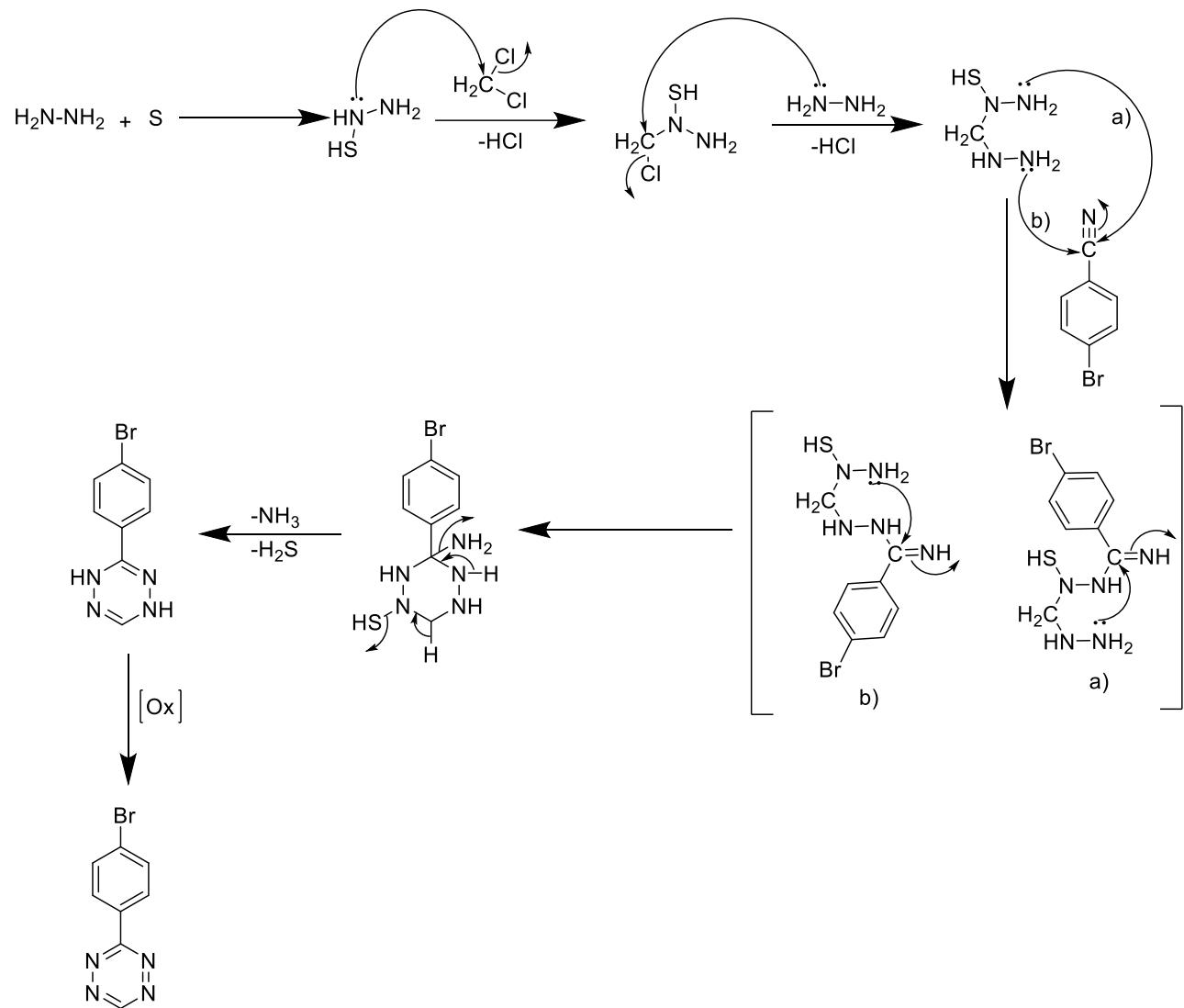
#### 3.4.2 Synthèse du précurseur 3

##### Etape 1: Réaction de formation de la tétrazine



**Schéma 36:** Synthèse du 3 - (4'-bromophényl) -1,2,4,5- tétrazine<sup>59</sup>.

## Mécanisme réactionnel



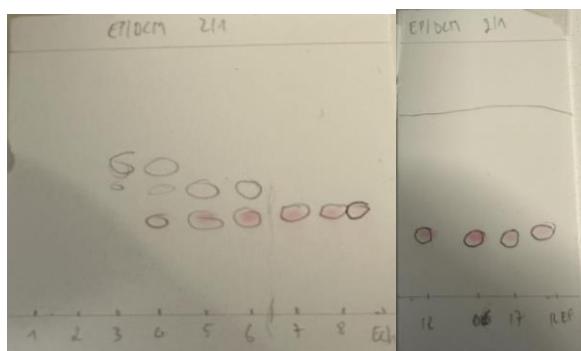
**Schéma 37:** Mécanisme réactionnel de formation du 3 - (4-bromophényl) -1,2,4,5-tétrazine<sup>60</sup>.

La première étape consiste en une réaction entre le soufre élémentaire et l'hydrazine pour former la thiohydrazine, puis une série de réaction de substitution nucléophile et de condensation conduit à la formation des précurseurs riches en azote en passant par la formation d'une imine. Par la suite un réarrangement avec cyclisation s'ensuit, avec une élimination de  $\text{NH}_3$  et  $\text{H}_2\text{S}$  suivi d'une oxydation pour former le cycle tétrazine stabilisé par la conjugaison aromatique.

## Discussion

Le rendement modéré (**49%**) de la réaction peut s'expliquer par le fait que la formation de la tétrazine impliquant de multiples étapes (succession de substitutions nucléophiles, oxydation condensation,...) peut générer plusieurs intermédiaires instables et conduire à des sous-produits. Ce rendement pourrait être amélioré par exemple en changeant le réactif

3-(parabromophényl)-1,2,4,5-tétrazine en 3-(pariodophényl)-1,2,4,5-tétrazine pour augmenter la réactivité de la réaction d'une part et également légèrement allonger le temps de la réaction d'autre part comme l'a fait Ida Vang et *al* pour obtenir un rendement de **58%** avec l'isomère en méta<sup>61</sup>. La réaction a été suivie par CCM (**Figure 22**) et le produit a été obtenu après purification par chromatographie sur colonne (**Figure 23**) dans le mélange PE/DCM (2/1) sur gel de silice.

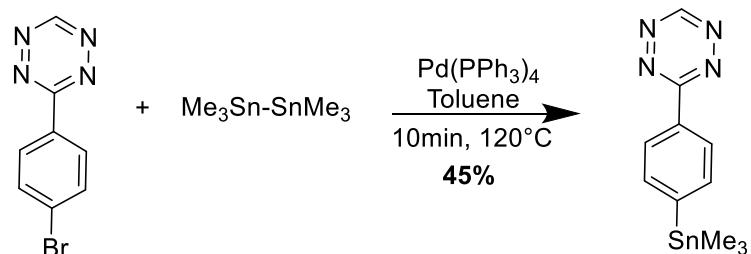


**Figure 22 :** Suivi CCM de la purification par chromatographie sur colonne



**Figure 23:** Purification par chromatographie sur colonne

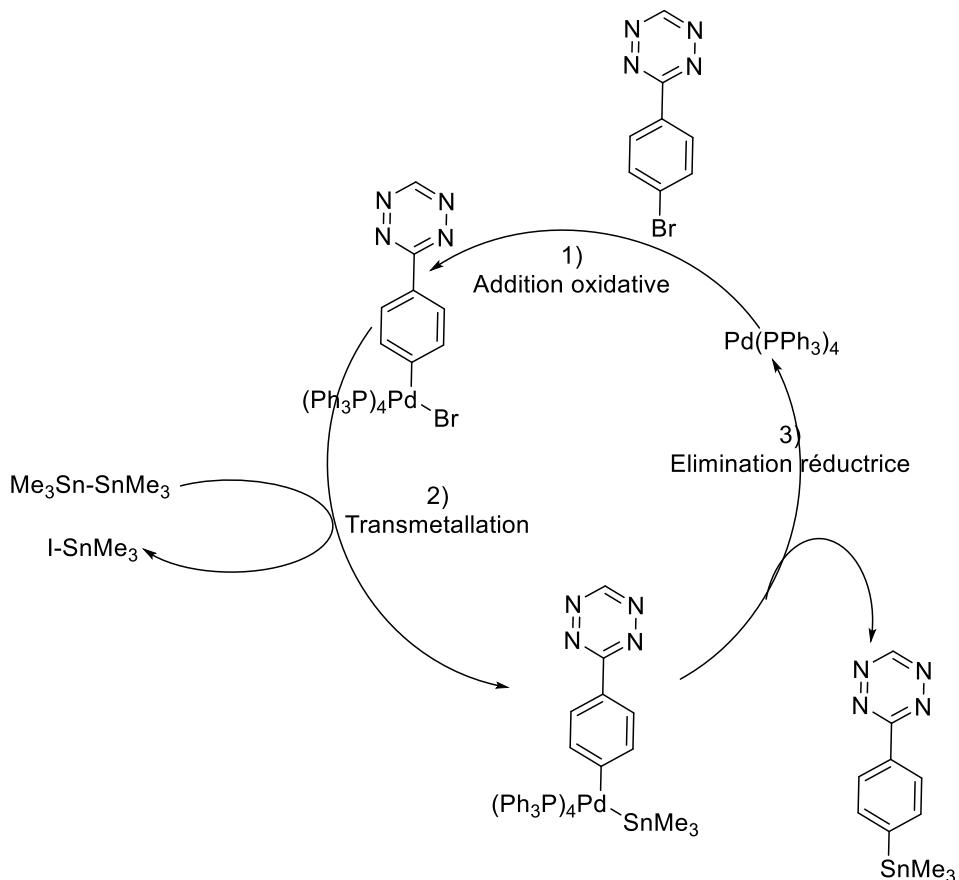
## Etape 2: Réaction de couplage au palladium



b) synthèse du précurseur 3

**Schéma 38:** Synthèse du 3-phényl (4'- triméthylstannyl) -1,2,4,5- tétrazine.

## Mécanisme réactionnel



**Schéma 39:** Mécanisme réactionnel de formation du 3-phényl (4'- triméthylstannyl) - 1,2,4,5- tétrazine<sup>58</sup>.

## Discussion

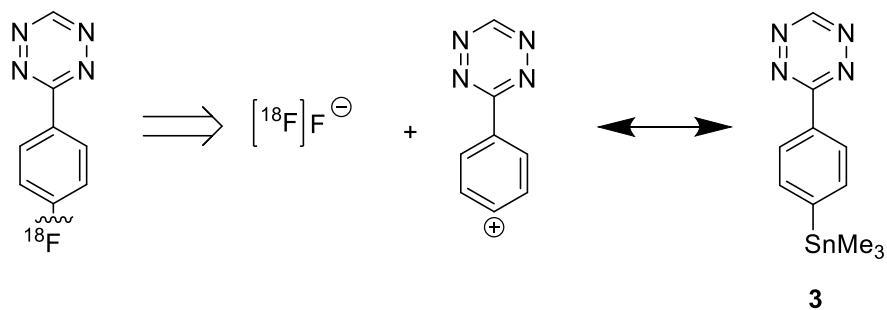
Le précurseur **2** a été synthétisé après plusieurs essais à partir du couplage au palladium, inspiré de la publication de Nagachinta et *al*, et de la synthèse de son isomère en méta par Rocío García-Vázquez et *al* d'autre part<sup>28,50,61</sup>. Le produit a été obtenu comme une poudre rose correspondant à **45%** de rendement sur une échelle de 0,5 gramme après purification par chromatographie sur colonne. Le faible rendement peut s'expliquer par plusieurs points à savoir: la réactivité des réactifs, les conditions expérimentales et la perte lors des purifications.

- En ce qui concerne la réactivité du substrat, la tétrazine étant un système très riche en électrons, elle peut rendre la réaction de couplage moins efficace en raison de la faible activation du site bromé.
- Quant aux conditions expérimentales; la température élevée, et un temps de réaction long peuvent entraîner la dégradation des réactifs et même du produits (**Schéma 38**). L'efficacité du catalyseur peut aussi intervenir lorsque ce dernier présente une moins bonne pureté.

Les cycles azotés comme la tétrazine étant instables et parfois sensibles aux conditions sévères (hautes températures, catalyseur métallique...) cela peut contribuer à une perte considérable de rendement. Ainsi pour améliorer le rendement il pourrait être judicieux d'optimiser les conditions réactionnelles en modifiant par exemple le catalyseur (utilisation d'un catalyseur avec des ligands plus efficaces tels que Xphos, Sphos, ...), ajouter une base douce (comme par exemple Et<sub>3</sub>N) pour stabiliser les intermédiaires. Cependant nous n'avons pas pu le réaliser du fait de la quantité de précurseurs, juste suffisante pour réaliser des tests de marquage.

### 3.5 Synthèse du radiotraceur 3- ([<sup>18</sup>F]parafluorophényl) -1,2,4,5- tétrazine

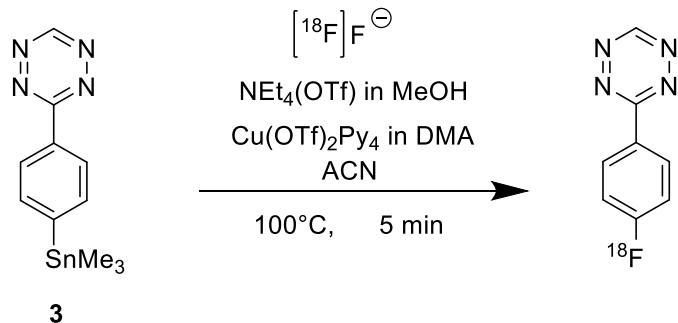
#### 3.5.1 Analyse retrosynthétique du traceur radiochimique 3- ([<sup>18</sup>F]parafluorophényl) -1,2,4,5- tétrazine



**Schéma 40:** Analyse retrosynthétique du radiotraceur.

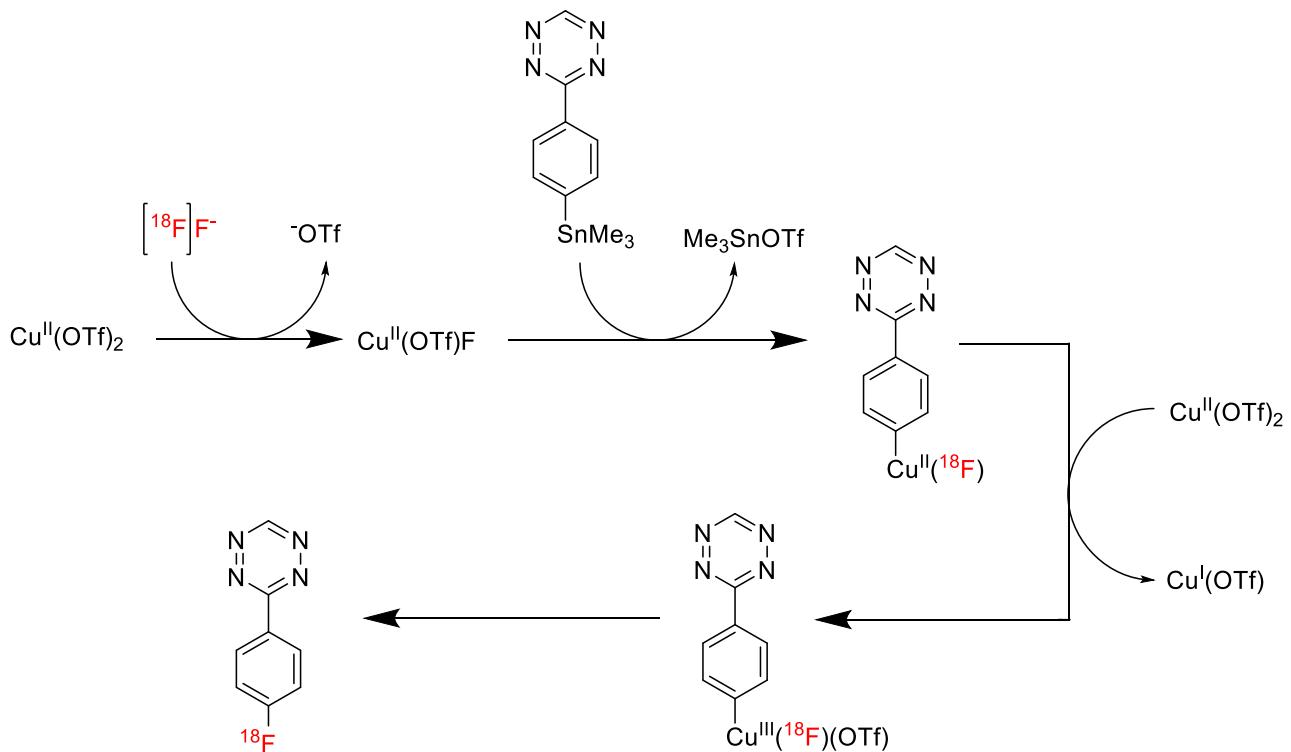
Le radiotraceur 3- ([<sup>18</sup>F]parafluorophényl) -1,2,4,5- tétrazine est obtenue par réaction à partir du 3-phenyl (4'- triméthylstannyl) -1,2,4,5- tétrazine (précurseur **3**) préalablement synthétisé, où l'ion  $[^{18}\text{F}]F^-$  jouera le rôle de nucléophile est et le  $-\text{SnMe}_3$  le rôle de groupement partant.

#### 3.5.2 Synthèse du radiotraceur 3- ([<sup>18</sup>F]parafluorophényl) -1,2,4,5- tétrazine



**Schéma 41:** Synthèse du 3- ([<sup>18</sup>F]parafluorophényl) -1,2,4,5- tétrazine inspiré de Rocío García-Vázquez<sup>28</sup>.

## Proposition de mécanisme réactionnel



**Schéma 42:** Possible mécanisme réactionnel de formation du 3- ( $[^{18}\text{F}]$ parafluorophényl) - 1,2,4,5- tétrazine inspiré de Yingda Ye et al<sup>62</sup>.

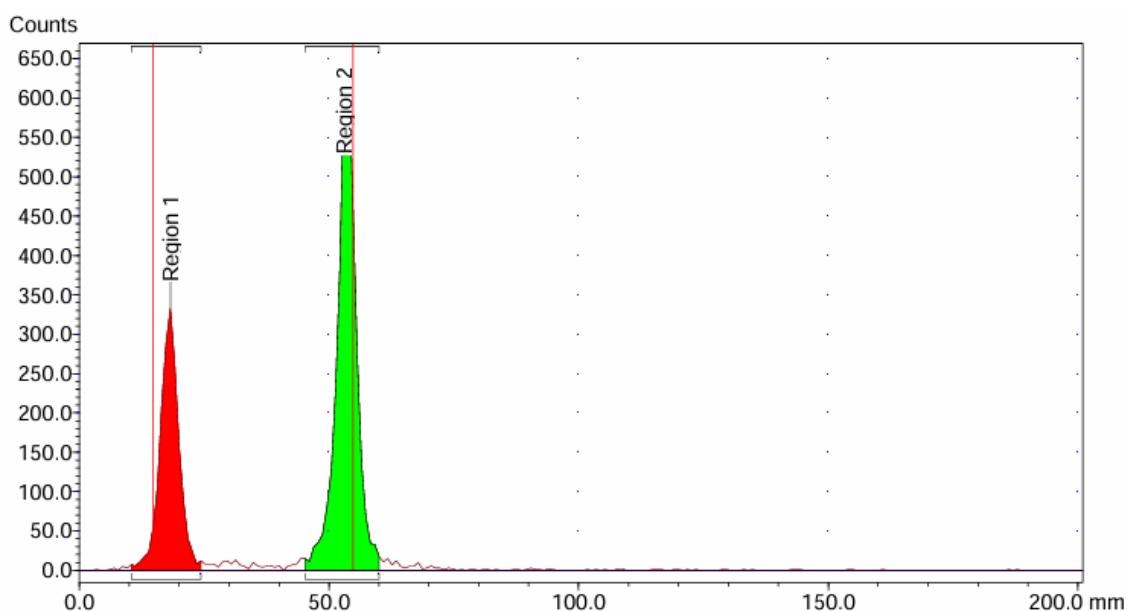
Ce mécanisme a été inspiré de celui proposé par Yingda Ye et al sur les aryltrifluoroborates où le complexe  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{OTf})_2$  joue à la fois le rôle de promoteur de la formation de la liaison C-F et d'autre part d'oxidant<sup>62</sup>. De plus, l'ajout de la pyridine a un impact considérable sur la réactivité<sup>26</sup>. Cependant, il n'existe pas encore un mécanisme type décrivant l'incorporation d'un fluorure sur un dérivé stannylé en présence de cuivre II.

## Discussion

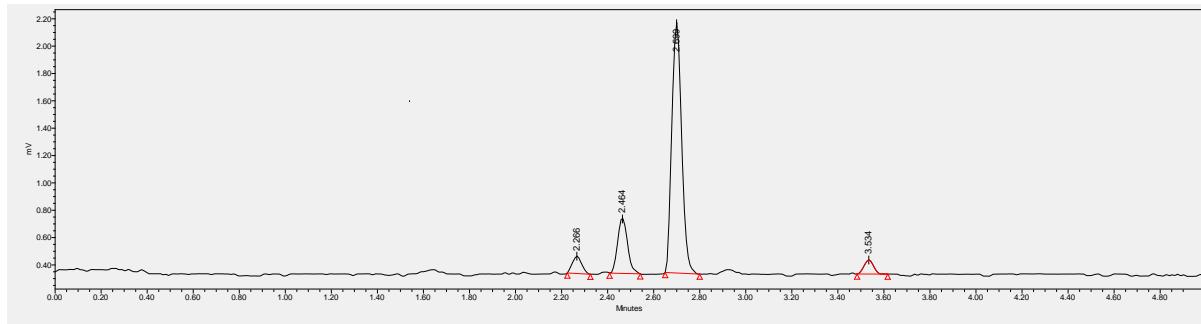
La synthèse radiochimique automatisée sur module All In One (Trasis) se fait généralement suivant le protocole ci-contre: Les ions  $[^{18}\text{F}]F^-$  récupérés depuis le cyclotron arrivent sur la cassette, puis sont piégés sur une cartouche échangeuse d'ion QMA carbonate. Par la suite une évaporation azéotropique sous vide et sous flux d'azote a lieu dans le but de sécher l'eau présente dans le milieu. Les ions  $[^{18}\text{F}]F^-$  sont ensuite élués dans le réacteur qui est mis à sec. On ajoute par la suite le précurseur, on fait le marquage. En effectuant le marquage on peut varier de nombreux paramètres (l'éluant, la température, le temps, la quantité de précurseurs, le solvant, la cartouche...). Après le marquage, on fait une pré-purification du composé en passant sur une cartouche. La pureté radiochimique est principalement évaluée par radio-TLC (**Figure 24, 26,28**) et confirmée par radio-HPLC (**Figure 25,27**). En effet la radio-TLC permet une analyse des composés radiomarqués par leur identification,

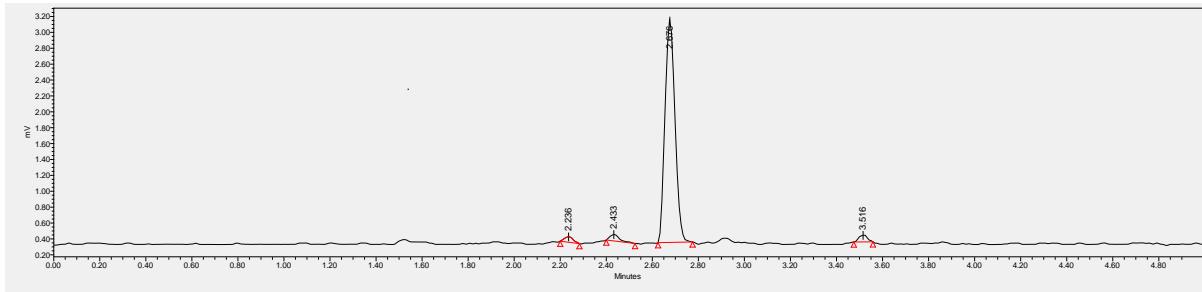
elle permet l'obtention du pourcentage de conversion radiochimique et la vérification de l'efficacité du marquage. Tandis que la radio-UPLC est utilisée pour le contrôle qualité et la caractérisation des composés radiomarqués et permet la détermination de la pureté radiochimique.

Lors de la synthèse, l'activité a été élueée dans le réacteur avec du  $\text{NEt}_4\text{OTf}$  (13,02 mg dans 700 $\mu\text{L}$  de MeOH). Ensuite le mélange précurseur (**3**) (6,44 mg; 0,02 mmol) et  $\text{Cu}^{II}(\text{OTf})_2\text{Py}_4$  (30 mg; 0,04 mmol) dans 1 mL de DMA ont été ajoutés au réacteur. Après réaction, le radiotraceur 3- ( $[^{18}\text{F}]$ parafluorophényl) -1,2,4,5- tétrazine a été obtenu. Afin de pré-purifier le produit obtenu, deux choix de cartouches phase inverse étaient proposés. D'une part les cartouches HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance), ce sont des types de phase solide utilisées pour la purification et l'extraction des composés radiomarqués, elles sont polyvalentes car elles peuvent traiter une large gamme de polarités (composés polaires et apolaires); d'autres part les cartouches C18 (octadécylsilane) qui sont plus sélectives et adaptées à l'extraction des composés apolaires. Ainsi dans un premier temps le marquage s'est fait à 100°C en utilisant une cartouche HLB, l'ACN comme solvant d'élution. Un pourcentage de conversion de 63% a été obtenu (**Figure 24**). Cependant la pureté radiochimique de 75% (**Figure 25**) a révélé la présence d'autres impuretés, et la quantité importante d'activité restée sur la cartouche HLB a conduit à une nouvelle synthèse en variant cette fois la température (90°C), en remplaçant l'ACN par l'éthanol comme solvant d'élution et en changeant la cartouche par une autre moins accrochante avec une facilité d'élution afin de récupérer une plus grande quantité de produit final: On est passé de la cartouche HLB à la cartouche C18. En effet le composé radiomarqué étant apolaire, la cartouche C18 est la mieux adaptée pour son extraction par rapport à la cartouche HLB.



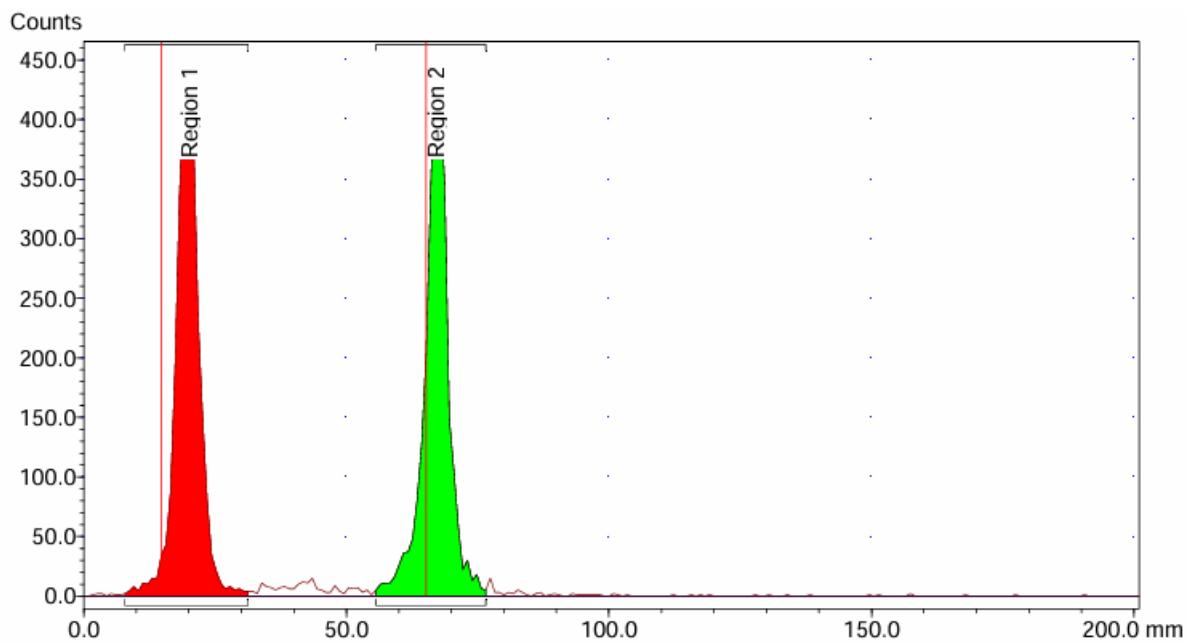
**Figure 24:** Chromatogramme radio-TLC de la synthèse N°1





**Figure 27:** Radio-UPLC de la synthèse N°2 du du traceur [18F] 3-parafluorophényl - 1,2,4,5- tétrazine.

La pureté radiochimique a été principalement évaluée par radio-TLC (**Figure 24, 26, 28**) et confirmée par radio-HPLC (**Figure 25, 27**).



**Figure 28:** Chromatogramme radio-TLC de la synthèse N°3.

**Tableau 2:** tableau comparatif des différentes synthèses effectuées en fonction des paramètres échangés.

	A <sub>0</sub> (MBq)	Acartouche mesurée (MBq)	Acartouche final (MBq)	Aflacon (MBq)	%conv	%pureté radiochim	Température	Cartouche utilisée	Solvant d'élution
1 <sup>ier</sup> essai	171,4	82,21	29,23	48,15	63%	75%	100°C	HLB	ACN
2 <sup>ième</sup> essai	173,2	67,77	8,75	55,88	61%	91%	90°C	C18	EtOH
3 <sup>ième</sup> essai	330,3	133,4	18,67	97,32	48%	83%	90°C	C18	EtOH

## 4 CONCLUSION

La synthèse et l'évaluation de groupes prosthétiques pour le radiomarquage des biomolécules ont eu pour but de mettre sur pied un ensemble de molécules organiques constituants les précurseurs pour le radiomarquage des biomolécules. L'étape clé lors de la synthèse de ces précurseurs est l'étape de la stannylation. Elle donne lieu aux précurseurs stannylés qui après une réaction de substitution sur un carbone aromatique conduisent au composé radiomarqué souhaité.

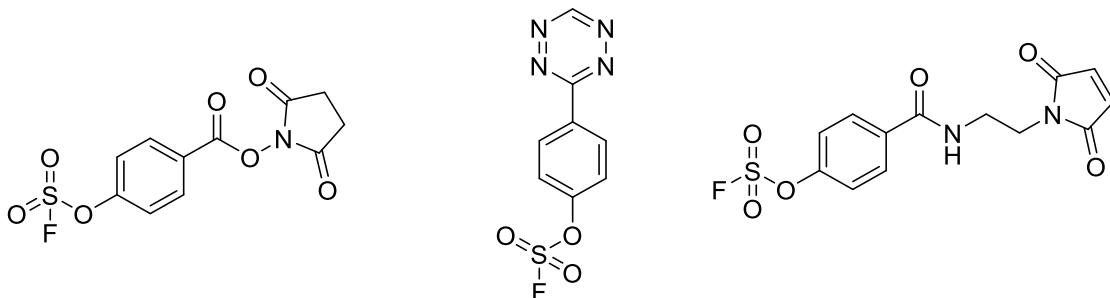
Ainsi, trois précurseurs stannylés ont été synthétisés, isolés et caractérisés sur la base des données spectrales (SM, RMN 1D, RMN 2D) et identifiés comme: le N-succinimidyl - 4 - (triméthylstanny) benzoate (**1**) (0,4645g; 1,22mmol; **84%**), le N-(2-maléimidoéthylamine) paratriméthylstannylbenzylamide (**2**) (0,2116g; 0,52mmol; **64%**), et le 3-phényl (4'- triméthylstanny) -1,2,4,5- tétrazine (**3**) (0,2554g; 0,796mmol; **45%**). Le traceur radiochimique 3- ( $[^{18}\text{F}]$ parafluorophényl) -1,2,4,5- tétrazine a été obtenu trois fois à partir du précurseur (**3**) avec des pourcentages de conversion de **63%**, **61%**, **48%** respectivement, en variant certains paramètres de synthèse. Ces précurseurs synthétisés ouvrent des perspectives innovantes et multidisciplinaires dans des interfaces entre la chimie, la biologie, la médecine nucléaire grâce à leur capacité à réagir avec des isotopes radioactifs, précisément le fluor-18, et jouent un rôle important dans le développement de nouveaux agents de diagnostiques.

Ces résultats montrent que le développement et l'optimisation de ces précurseurs pourraient améliorer les pratiques actuelles en médecine nucléaire, tout en ouvrant la voie à des approches non seulement plus sûres, mais aussi plus précises et plus efficaces pour le diagnostic et le traitement des maladies.

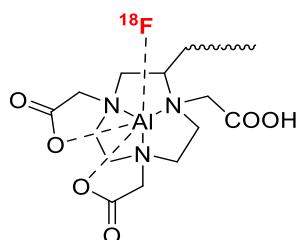
## **5 PERSPECTIVES FUTURES**

Dans la suite de nos travaux de recherches, nous envisageons de:

- ✚ Terminer le radiomarquage des précurseurs synthétisés,
- ✚ Réaliser ces marquages via un automate de synthèse
- ✚ Réaliser la purification de ces groupements prosthétiques radiomarqués
- ✚ Mettre au point un contrôle qualité
- ✚ Utiliser ces groupements prosthétiques marqués au  $^{18}\text{F}$  et réaliser des marquages sur une petite bibliothèque de biomolécules (peptide, Nanobody, protéine, anticorps...)
- ✚ Automatiser ces marquages de biomolécules sur module en incluant la purification
- ✚ En ce qui concerne le développement de nouveaux groupes prosthétiques, poursuivre avec la synthèse des nouveaux précurseurs en partant des SUFEx (**Figure 29**) et si possible des dérivés de l'aluminium (**Figure 30**); dans le but d'obtenir une meilleure efficacité de radiomarquage, et une compatibilité avec les biomolécules (anticorps, peptides,...)
- ✚ préparer les traceurs synthétisés afin de les tester pour un usage en chimie clinique.



**Figure 29:** Quelques précurseurs SUFEx.



**Figure 30:** exemple de précurseur de complexation Al-F

## **6 PARTIE EXPERIMENTALE**

## 6.1 Partie chimie organique

### 6.1.1 Matériels

**Les réactifs et solvants:** Les réactifs et solvants utilisés lors des différentes manipulations sont de diverses provenances; ils proviennent de Sigma-Aldrich, Apollo Scientific, Merck, Acros Organics, TCI, Fluka, ABCR. Ils ont été utilisés sans purification au préalable.

**Chromatographie:** Le gel de silice utilisé pour les purifications provient de chez sigma aldrich avec pour épaisseur 0,040-0,063 mm. Les différentes colonnes chromatographiques utilisées pour purification ont pour caractéristiques: 40 cm de long pour 4 cm d'épaisseur et 27 cm de longueur pour 5 cm d'épaisseur. Les plaques CCM utilisés proviennent de chez Merck, avec une épaisseur de 0.20mm et sont fluorescent à l'UV 254nm. Les évaporateurs rotatifs utilisés sont ceux de Heidolph et d'Ibx instruments.

**Spectroscopie RMN:** les spectres RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , ont été obtenus soit à partir de la 400MHz, soit de 400neo; tous provenant du spectromètre Advance Bruker. Ces spectres ont été traités grâce à l'utilisation du logiciel Mestrenova 10.

**Analyses UPLC:** Les analyses UPLC radiochimiques et non radiochimiques ont été effectuées sur UPLC Acquity BEH C18 1,7 $\mu\text{m}$ . Les colonnes utilisées sont toutes de dimension 2,1 mm X100 mm et proviennent de la marque Waters. Le détecteur radiochimique est e-SAT/IN. Le tableau suivant présente les gradients utilisés pour les différentes analyses UPLC faites (**Tableau 2**).

**Tableau 2:** Gradient utilisé en UPLC pour 5 min d'injection.

Temps (min)	Flux (mL/min)	0,1% TFA dans H <sub>2</sub> O(%)	%ACN
0,00	0,5	90,0	10,0
3,00	0,5	0,0	100,0
3,80	0,5	0,0	100,0
5,00	0,5	90,0	10,0

**Tableau 2:** Gradient utilisé en UPLC pour 10 min d'injection.

Temps (min)	Flux (mL/min)	0,1% TFA dans H <sub>2</sub> O(%)	%ACN
0,00	0,5	90,0	10,0
3,00	0,5	0,0	100,0
3,80	0,5	0,0	100,0
5,00	0,5	90,0	10,0

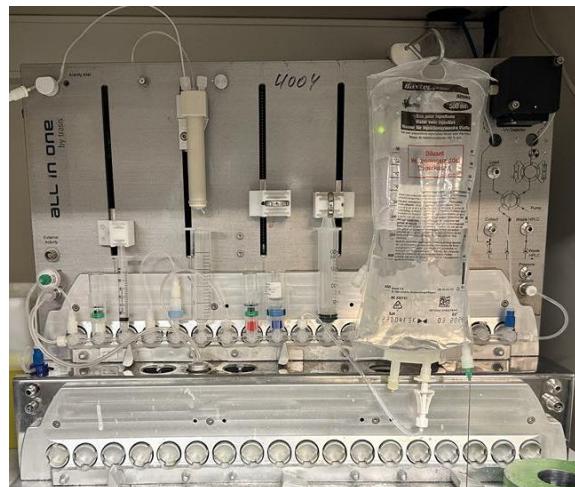
7,00	0,5	0,0	100,0
9,00	0,5	0,0	100,0
9,50	0,5	95,0	5,0
10,00	0,5	95,0	5,0

**La radioactivité:** les ions  $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$  ont été fournis par le cyclotron du CRC.

**Automate de synthèse:** l'automate de synthèse All in one et son kit utilisés pour effectuer la chimie chaude proviennent de chez Trasis (**Figure 31**).

**Les cartouches QMA** utilisés sont les Sep Pak Carbonate Plus Light de 46mg d'adsorbant et provenant de Waters.

**Un scanner AR-2000 Bioscan (Figure 32)** provenant de Eckert & Ziegler a été utilisé dans le but d'effectuer les analyses CCM radiochimiques.



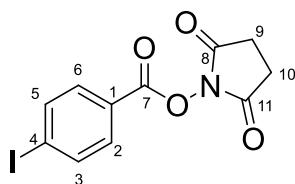
**Figure 31:** Automate de synthèse All in one avec cassette insérée.



**Figure 32:** Scanner pour CCM radiochimique AR-2000 Bioscan de Eckert & Ziegler.

### 6.1.2 Méthodes expérimentales

#### N-succinimidyl - 4 - iodobenzoate (1a)



Aspect physique: **solide blanc**

Formule chimique: **C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>NI**

Masse molaire moléculaire: **345,09 g.mol<sup>-1</sup>**

Rendement: **47%**

Point de fusion: **134-139°C**

Dans un ballon sec de 250mL rincé avec de l'acétone, a été introduit de l'acide paraiodobenzoïque (4,1277g; 14,5mmol), du N-hydroxysuccinimide (1,8818g; 16,4mmol), du N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (4,49g; 21,8mmol) dans du dichlorométhane (120mL). La réaction s'est déroulée à température ambiante et sous atmosphère d'azote pendant 5h. Le précipité blanc obtenu a été filtré et le solide obtenu a été purifié par trituration en utilisant le système PE/AE (6/4), filtré et séché en utilisant une pompe à vide. Le N-succinimidyl - 4 - iodobenzoate (**1a**) a été identifié comme un solide blanc (2,3296g; 6,75mmol; **47%**).

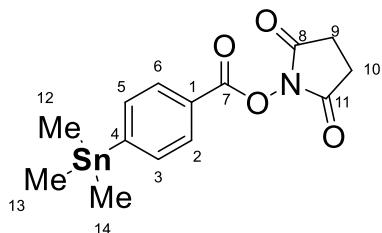
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm): 7,89 (d; *J*=8,6 Hz; 2H; H<sub>2</sub> et H<sub>6</sub>), 7,83 (d; *J*=8,6 Hz; 2H; H<sub>3</sub> et H<sub>5</sub>), 2,91 (s; 4H; H<sub>9</sub> et H<sub>10</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100,55 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm): 169,0 (C<sub>8</sub>, C<sub>11</sub>); 161,6 (C<sub>7</sub>); 138,4 (C<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>); 131,7 (C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>); 124,6 (C<sub>1</sub>); 103,4 (C<sub>4</sub>); 25,7 (C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>).

**UPLC-MS:** [M]<sup>+</sup>; Calculée: 345,09 m/z; trouvée: 345, 95 m/z.

**TLC:** PE/AE (6/4), RF = 0,4; révélé avec du permanganate.

#### N-succinimidyl - 4 - (triméthylstannylyl) benzoate (1)



Aspect physique: **solide beige**

Formule chimique: **C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>O<sub>4</sub>NSn**

Masse molaire moléculaire: **382 g.mol<sup>-1</sup>**

Rendement: **84%**

Dans un ballon sec de 250mL rincé avec de l'acétone, a été introduit du paraiodobenzoate de succinimide (0,503g; 14,6mmol), de l'hexaméthyldiéthain (1,1mL; 5,27mmol), du palladium tétrakis triphénylphosphine (84,1mg; 0,0727mmol) dans du toluène (50mL). Le système a été mis sous atmosphère d'azote, et ensuite la solution a été fermée par l'utilisation d'un septum et chauffé dans un bloc en aluminium à 120°C pendant 15 min jusqu'à obtention d'une solution sombre. Elle a ensuite été filtrée sur céléite et puis purifiée par chromatographie sur colonne (PE/AE: 6/4) en effectuant un dépôt solide, et le N-

succinimidyl - 4 - (triméthylstannylyl) benzoate (**1**) a été obtenu comme un solide beige (0,4645g; 1,22mmol; **84%**).

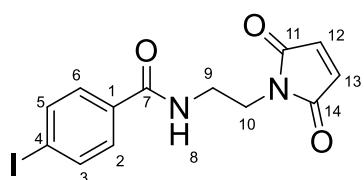
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm): 8,05 (m ; 2H; H<sub>2</sub> et H<sub>6</sub>), 7,65 (m; 2H; H<sub>3</sub> et H<sub>5</sub>), 2,90 (s; 4H; H<sub>9</sub> et H<sub>10</sub>); 0,34 (s; 9H; H<sub>12</sub>, H<sub>13</sub> et H<sub>14</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100,55 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm): 169,2 (C<sub>8</sub>, C<sub>11</sub>); 162,4 (C<sub>7</sub>); 153,2 (C<sub>4</sub>); 136,4 (C<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>); 129,4 (C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>); 124,6 (C<sub>1</sub>); 25,8 (C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>); -9,6 (C<sub>12</sub>, C<sub>13</sub>, C<sub>14</sub>).

**UPLC-MS:** [M]<sup>+</sup>; Calculée: 381,99 m/z; trouvée: 382, 83 m/z.

**TLC:** PE/AE (6/4), RF = 0,41 ; révélé avec de l'acide phosphomolybdique.

### N-(2-maléimidoéthylamine) paraiodobenzylamide (**2a**)



Aspect physique: **solide blanc**

Formule chimique: **C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>I**

Masse molaire moléculaire: **370,14 g.mol<sup>-1</sup>**

Rendement: **49%**

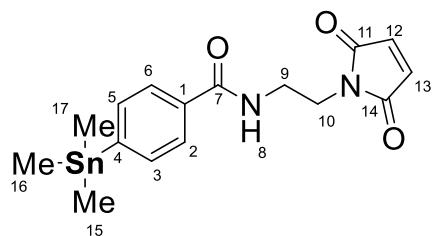
Dans un ballon sec de 100mL rincé avec de l'acétone, a été introduit du N-(2-aminoéthyl) maléimide trifluoroacétate (0,4295g; 1,16mmol) dans du dichlorométhane (11,6mL), du N-succinimidyl - 4 - iodobenzoate (0,1502g; 0,43mmol) et de la DIPEA (0,101mL; 0,58mmol). La réaction s'est déroulée à température ambiante pendant 20 h. La solution rose obtenue a été lavé avec de l'acide chlorhydrique (0,1M; 4×15mL) et de l'eau (3×10mL). La phase organique a été récupérée et filtrée après ajout du desséchant Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ensuite évaporée. Le solide blanc obtenu après purification par dépôt solide sur colonne chromatographie dans le système PE/AE (5/5) a été identifié comme le N-(2-maléimidoéthylamine) paraiodobenzylamide (**2a**) (0,2013g; 0,97mmol; **57%**).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO)** δ (ppm): 8,65 (t ; J=5,6 Hz 1H, H<sub>8</sub>), 8,10 (d ; J=8,5 Hz; 2H; H<sub>2</sub> et H<sub>6</sub>), 7,87 (d ; J=8,3 Hz; 2H; H<sub>13</sub> et H<sub>14</sub>), 7,55 (d ; J=8,4 Hz; 2H; H<sub>3</sub> et H<sub>5</sub>), 3,61 (t ; J=5,6 Hz 2H, H<sub>10</sub>), 3,43 (q ; J=5,8 Hz 2H, H<sub>9</sub>).

**UPLC-MS:**[M]<sup>+</sup>; Calculée: 370,14 m/z; trouvée: 370,94 m/z

**TLC:** PE/AE (6/4), RF = 0,41 ; révélé avec le réactif de dragendorff.

### N-(2-maléimidoéthylamine) paratriméthylstannylbenzylamide (**2**)



Aspect physique: **solide blanc**

Formule chimique : **C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>Sn**

Masse molaire moléculaire: **407 g.mol<sup>-1</sup>**

Rendement: **64%**

Dans un ballon sec de 250mL rincé avec de l'acétone, a été introduit du N-(2-maléimidoéthylamine) paraiodobenzylamide (0,191g; 0,516mmol), de l'hexaméthyldiéthain (0,39mL; 1,872mmol), du palladium tétrakis triphénylphosphine (30mg: 0,026mmol) dans du toluène (40mL). Le système a été mis sous atmosphère d'azote, et ensuite la solution a été fermée par l'utilisation d'un septum et chauffé dans un bloc en aluminium à 120°C pendant 15 min jusqu'à obtention d'une solution sombre. Elle a ensuite été filtrée sur célite et puis purifiée par chromatographie sur colonne (PE/AE: 7/3) en effectuant un dépôt solide, et du N-(2-maléimidoéthylamine) paratriméthylstannylobenzylamide (**2**) a été obtenu comme un solide beige (0,2116g; 0,52mmol; **64%**).

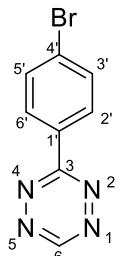
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm): 7,69 (d ; *J*=8,0 Hz 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub>), 7,56 (d ; *J*=8,0 Hz; 2H; H<sub>3</sub> et H<sub>5</sub>), 6,72 (s; 2H; H<sub>12</sub> et H<sub>13</sub>), 6,65 (s ; 1H; H<sub>3</sub>), 3,83 (dd ; *J*=6,4 et 4,2 Hz 2H, H<sub>10</sub>), 3,66 (q ; *J*=5,3 Hz 2H, H<sub>9</sub>), 0,27 (s; 9H; H<sub>15</sub>, H<sub>16</sub>, H<sub>17</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100,55 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm): 170,9 (C<sub>11</sub> et C<sub>14</sub>); 167,8 (C<sub>7</sub>); 147,6 (C<sub>4</sub>), 136,0 (C<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>); 134,0 (C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>), 133,6 (C<sub>1</sub>), 39,6 (C<sub>15</sub>), 37,5 (C<sub>14</sub>), -9,72 (C<sub>15</sub>, C<sub>16</sub>, C<sub>17</sub>).

**UPLC-MS:** [M]<sup>+</sup>; Calculée: 407,05 m/z; trouvée: 407,95 m/z

**TLC:** PE/AE (6/4), RF = 0,41 ; révélé avec de l'acide phosphomolybdique.

### 3-phényl (4'- Bromo) -1,2,4,5- tétrazine (**3a**)



Aspect physique: **poudre rose**

Formule chimique: **C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>N<sub>4</sub>Br**

Masse molaire moléculaire: **237,06 g.mol<sup>-1</sup>**

Rendement: **49%**

Point de fusion: **182-184°C**

Dans un ballon sec de 25mL rincé avec de l'acétone, a été introduit du soufre (0,2703g; 8,45mmol), du parabromobenzonitrile (0,7723g; 4,24mmol), du dichlorométhane (0,3mL; 4,77mmol) dans de l'éthanol (4,21mL). Le système a été mis sous atmosphère d'azote, et ensuite nous avons ajouté goutte à goutte de l'hydrazine (1,8mL; 37,11mmol). La solution jaune sombre obtenue a été fermée par l'utilisation d'un septum et chauffé dans un bain d'huile à 50°C pendant 20,5 h. La solution a été transvasée à température ambiante dans un erlen meyer, et elle a été ajouté du nitrite de sodium (2,9588g; 42,88mmol) et du dichlorométhane (15mL) préalablement dissous dans de l'eau (42,5mL). De l'acide acétique (15,21g; 253,6mmol) a été ajouté, et la solution rose obtenue a été extraite avec du dichlorométhane (3x10mL). La solution a été filtrée et purifiée par chromatographie sur colonne (PE/DCM: 2/1) en effectuant un dépôt solide, et du 3-phényl (4'- Bromo) -1,2,4,5-tétrazine (**3a**) a été obtenu comme un solide rose (0,494g; 2,08mmol; **49%**).

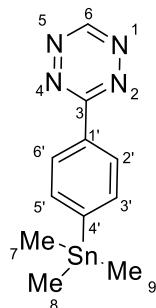
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm): 10,24 (s ; 1H), 8,51 (d ; J=8,51 Hz; 2H; H<sub>2'</sub> et H<sub>6'</sub>), 7,76 (d ; J=8,7 Hz; 2H; H<sub>3'</sub> et H<sub>5'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100,55 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm): 166,0 (C<sub>3</sub>); 157,9 (C<sub>6</sub>); 132,7 (C<sub>2'</sub>, C<sub>6'</sub>); 130,5 (C<sub>1'</sub>); 129,7 (C<sub>3'</sub>, C<sub>5'</sub>); 128,5 (C<sub>4'</sub>).

**UPLC-MS:** [M]<sup>+</sup>; Calculée: 235,97 m/z; trouvée: 237,06 m/z

**TLC:** PE/DCM (2/1), RF = 0,35.

### 3-phényl (4'- triméthylstannyl) -1,2,4,5- tétrazine (3)



Aspect physique: **solide rose**

Formule chimique: **C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>Sn**

Masse molaire moléculaire: **320,71 g.mol<sup>-1</sup>**

Rendement: **45%**

Dans un ballon sec de 250mL rincé avec de l'acétone, a été introduit du 3-paraiodophényl-1,2,4,5- tétrazine (0,4996g; 1,76mmol), de l'hexaméthyldiéthain (2,0842g; 6,36mmol), du palladium tétrakis triphénylphosphine (101,7mg; 0,09mmol) dans du toluène (50mL). Le système a été mis sous atmosphère d'azote, et ensuite la solution a été fermée par l'utilisation d'un septum et chauffé dans un bain d'huile à 120°C pendant 10 min jusqu'à obtention d'une solution sombre. Elle a ensuite été filtrée sur cérite et puis purifiée par chromatographie sur colonne (PE/AE: 98/2) et du 3-phényl (4'- triméthylstannyl) -1,2,4,5- tétrazine (**3**) a été obtenu comme un solide rose (0,2554g; 0,796mmol; **45%**).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm): 10,23 (s ; 1H, H<sub>6</sub>), 8,58 (d ; J=8,2 Hz; 2H; H<sub>2'</sub> et H<sub>6'</sub>), 7,77 (d ; J=8,2 Hz; 2H; H<sub>3'</sub> et H<sub>5'</sub>), 0,39 (s, 9H, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>9</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100,55 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm): 166,7 (C<sub>3</sub>); 157,6 (C<sub>6</sub>); 150,2 (C<sub>4'</sub>), 136,9 (C<sub>2'</sub>, C<sub>6'</sub>); 131,3 (C<sub>1'</sub>); 127,1 (C<sub>3'</sub>, C<sub>5'</sub>).

**UPLC-MS:** [M]<sup>+</sup>; Calculée: 320,71 m/z; trouvée: 321, 83 m/z.

**TLC:** PE/AE (6/4), RF = 0,41 ; révélé avec de l'acide phosphomolybdique.

## 6.2 Partie radiochimie

### 6.2.1 Considérations générales

Toutes les réactions de marquage ont été effectuées sur l'automate de synthèse All in one provenant de la firme Trasis (**Figure 32**) en utilisant du  $[^{18}\text{F}]$  fluorure dans du  $[^{18}\text{O}]$  $\text{H}_2\text{O}$  (150-350 MBq).

Les chromatogrammes radio-UPLC ont été obtenus à l'aide du système d'ACQUITY UPLC H-Class PLUS de chez Waters<sup>TM</sup> équipé de HERM LB500 avec détecteur fLumo et des détecteurs ACQUITY Premier photodiode Array (PDA) eλ.

Radio-TLC: la TLC a été réalisé sur POLYGRAM SIL G/UV 254 (0,20 mm), avec comme éluant 100% d'acétate d'éthyle.

Les rendements radiochimiques ont été calculés comme suit :

- La conversion radiochimique (RCC) a été déterminée à l'aide des chromatogrammes radio-CCM du mélange de marquage brut éteint et correspond à l'aire sous la courbe du pic radioactif divisée par l'aire sous la courbe du pic de fluorure  $[^{18}\text{F}]$ . La radio-CCM a été faite en utilisant un scanner pour CCM radiochimique AR-2000 Bioscan d'Eckert & Ziegler.

- Le pourcentage de pureté radiochimique a été calculé en divisant l'aire sous la courbe du pic radioactif par la somme des aires sous la courbe des différents pics.

Diverses cartouches d'extraction en phase solide (SPE) ont été utilisées dans les expériences de radiomarquage décrites ci-après. Ces cartouches ont été utilisées/conditionnées comme suit :

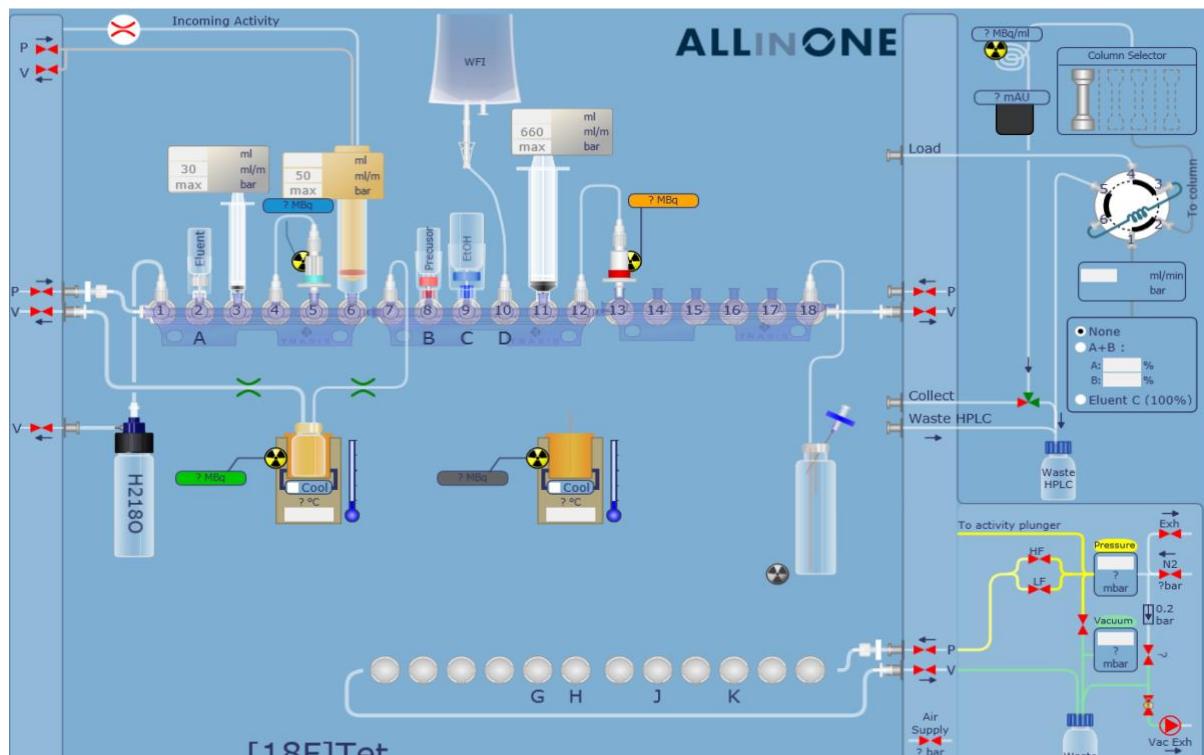
**La cartouche Sep-Pak Accell Plus QMA Carbonate Plus Light** (46 mg, Waters Cat. no. 186004540) a été utilisée telle quelle, sans conditionnement.

**La cartouche Sep-Pak tC18 Plus Light** (145 mg, Waters Cat. no. WAT036805) et **la cartouche Oasis HLB Plus Light** (30 mg, Waters Cat. no. 186005125) ont été rincées avec de l'éthanol (5 mL), de l'eau HPLC (10 mL) et séchées à l'air (10 mL).

### 6.2.2 Radiosynthèse automatisée du traceur $[^{18}\text{F}]$ 3-parafluorophényl -1,2,4,5- tétrazine

#### 6.2.2.1 Assemblage de cassette

La cassette a été assemblée à l'aide de consommables standards de chez Trasis comme suit (**Figure S1 et Tableau S1**).



**Figure S1:** Schéma de la cassette/du kit utilisé pour la radiosynthèse automatisée du traceur  $[^{18}\text{F}]$  3-parafluorophényl -1,2,4,5- tétrazine sur le module All In One.

**Tableau S1:** Liste des cartouches nécessaires à l'assemblage de la cassette.

Position	Type1	Qté	Unité	Cat n.o.
1	Sep-Pak Accell Plus QMA Carbonate Plus Light	46 mg	1	186004540
2	Sep-Pak tC18 Plus Light	145 mg	1	WAT036805
2	Oasis HLB Plus Light	30 mg	1	186005125

### 6.2.2.2 Kit de réactifs

**Tableau S2:** Liste des produits chimiques du kit de réactifs nécessaires à la production d'un traceur  $[^{18}\text{F}]$  3-parafluorophényl -1,2,4,5- tétrazine.

Position	Type	Composition	Conteneur	Préparation/Stockage
1	Net <sub>4</sub> OTf	13,02 mg	3 mL	La solution peut être préparée plusieurs jours avant la synthèse et stockée à température ambiante (25°C)
1	MeOH	700 $\mu\text{L}$		
2	Précureur 3	6,44 mg	3 mL	La solution doit être préparée quelque
2	Cu <sup>II</sup> Py <sub>4</sub> (OTf) <sub>2</sub>	30 mg		

2	DMA	1 mL		minute avant le début de la synthèse
3	ACN/EtOH	10 mL	7 mL	La solution peut être préparée plusieurs semaines ou mois avant la synthèse et stockée à température ambiante (25°C)

### 6.2.2.3 Description du processus

#### 6.2.2.3.1 Etapes préliminaires

Dans le but de préparer les différentes synthèses radiochimiques, une préparation des différentes solutions est nécessaire et suivant un timing bien précis, car certaines solutions doivent être préparée quelques minutes avant la synthèse et d'autres peuvent être préparées plusieurs semaines avant la synthèse. Avant le radiomarquage, un test de la cassette est fait dans le but de s'assurer de la synchronisation et de la connexion entre les instructions données et les mouvements exécutés dans toutes les positions de l'automate afin d'éviter des synthèses défectueuses du fait du mauvais dispositif.

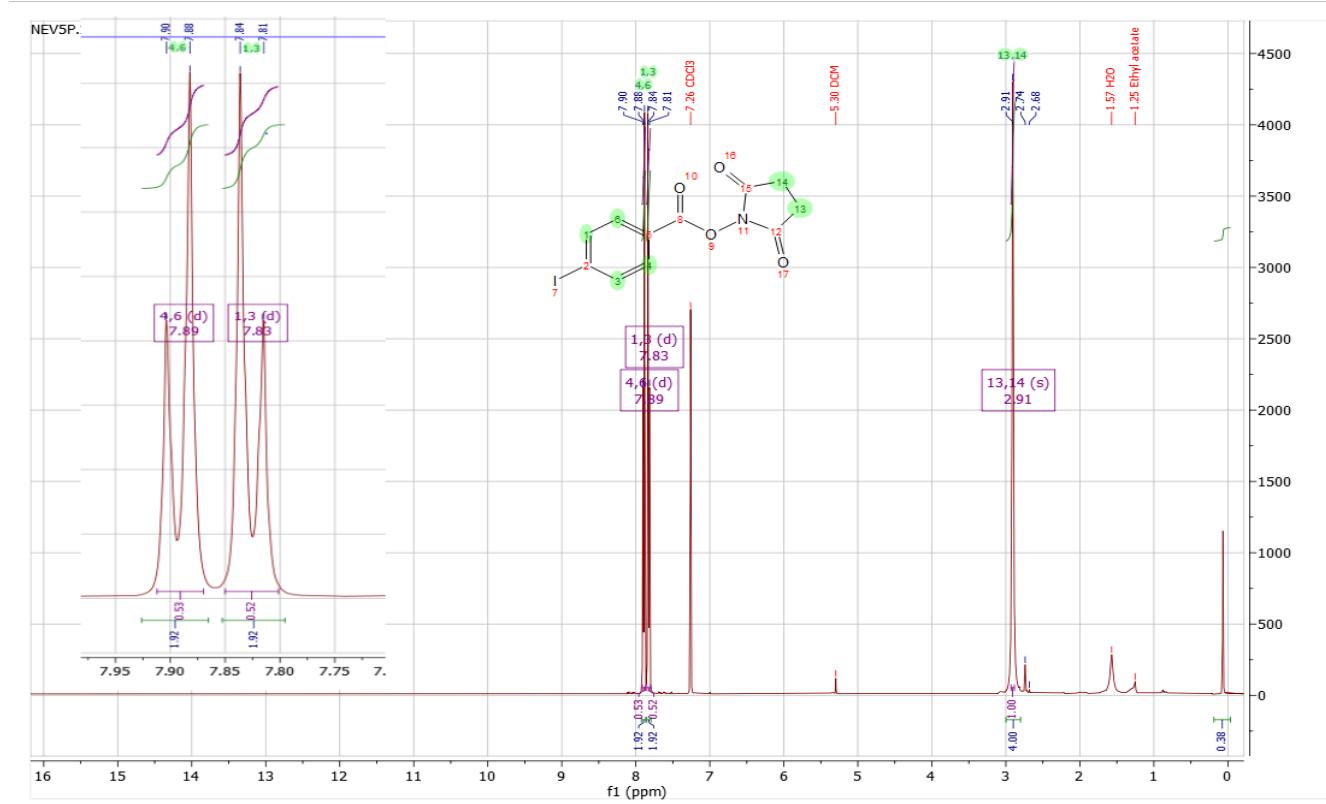
Ainsi afin d'obtenir 0,047 mmol de  $\text{Net}_4\text{OTf}$  dans 700  $\mu\text{L}$  de MeOH, une solution mère de  $\text{Net}_4\text{OTf}$  (186,07 mg; 0,67 mmol dans 10 mL de MeOH) a été préparé et conservée à température ambiante. Dans le but de débuter la synthèse, 700  $\mu\text{L}$  de cette solution a été prélevée et introduit dans un Vial en verre de 3 mL, et encapsulé puis positionné dans le module de synthèse. Par la suite, une solution d'un mélange du précurseur **3** (6,44 mg; 0,02 mmol) et du complexe  $\text{Cu}^{II}\text{Py}_4(\text{OTf})_2$  (30 mg; 0,04 mmol) dans 1 mL de DMA a été préparée, homogénéisée, encapsulée dans un vial de 3 mL et insérée dans l'automate de synthèse. Puis une solution d'acétonitrile/ou EtOH préalablement préparée dans un flacon en verre de 7 mL a été introduite dans le module de synthèse. La synthèse débute généralement avec un conditionnement de la cassette, et donc de la cartouche avec de l'ACN/ou EtOH et puis avec de l'eau de synthèse.

#### 6.2.2.3.2 Radiosynthèse

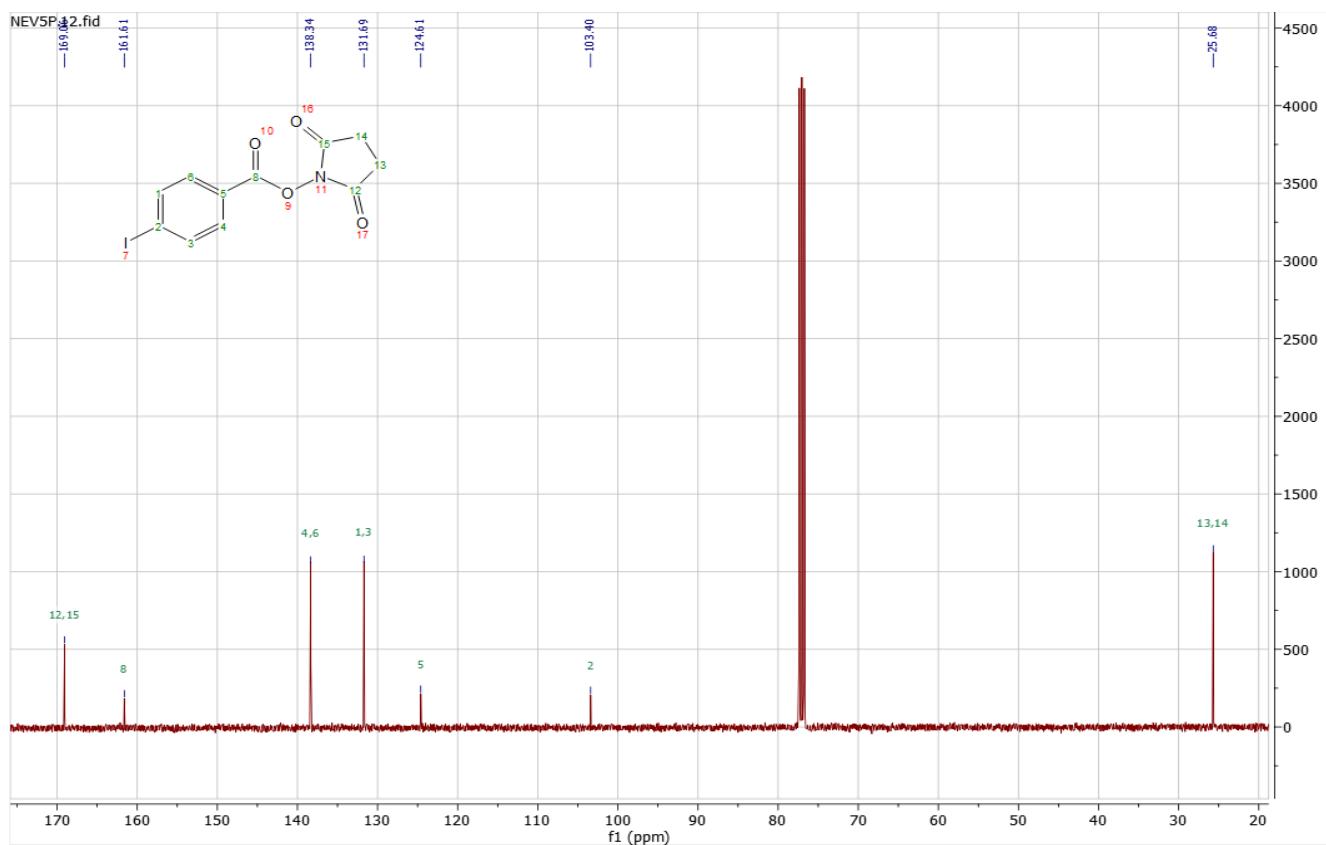
L'eau enrichie en fluor-18, récupérée directement depuis le cyclotron, est arrivée dans le synthétiseur (**position 6**), puis passée à travers la cartouche QMA carbonate (**position 5**). La cartouche a ensuite été séchée à trois reprises en utilisant 2 mL d'acétonitrile et un flux d'argon. Le fluor-18 a par la suite a été élué à l'aide d'une solution (**position 2**) de  $\text{Net}_4(\text{OTf})$

(13,02 mg; dans 700  $\mu$ L de MeOH) jusqu'au réacteur (**position 7**). Le précurseur **3** (6,44 mg) préalablement mélangé avec du Cu<sup>II</sup>Py<sub>4</sub>(OTf)<sub>2</sub> (30 mg) et solubilisé dans du DMA (1 mL) (**position 8**), a été ajouté dans le réacteur. A l'aide de valves de compression, les tubulures d'entrée et de sortie ont été hermétiquement fermées et la réaction de marquage a été réalisée à 90°C ou 100°C et ce pendant 5 min. Une fois la réaction terminée, la solution brute a été diluée avec de l'eau (**position 10**) et puis grâce à la cartouche HLB/ou tC18 (**position 13**), la solution a été purifiée. Afin d'éliminer les résidus, la cartouche a été lavée et rincée avec de l'eau puis un flux d'azote. Le radiotraceur obtenu a été élué avec de l'ACN/ou EtOH (**position 9**) puis transféré dans un flacon en verre (**position 18**).

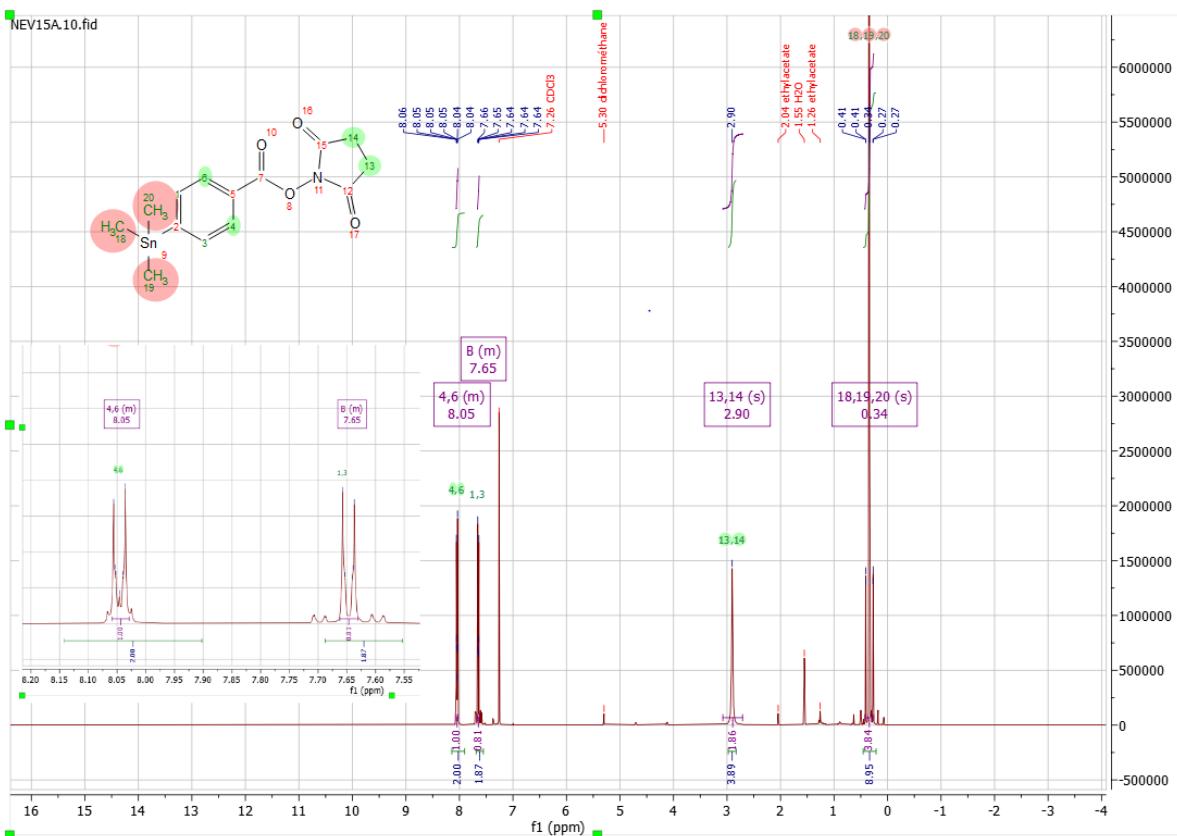
## **7 ANNEXES**



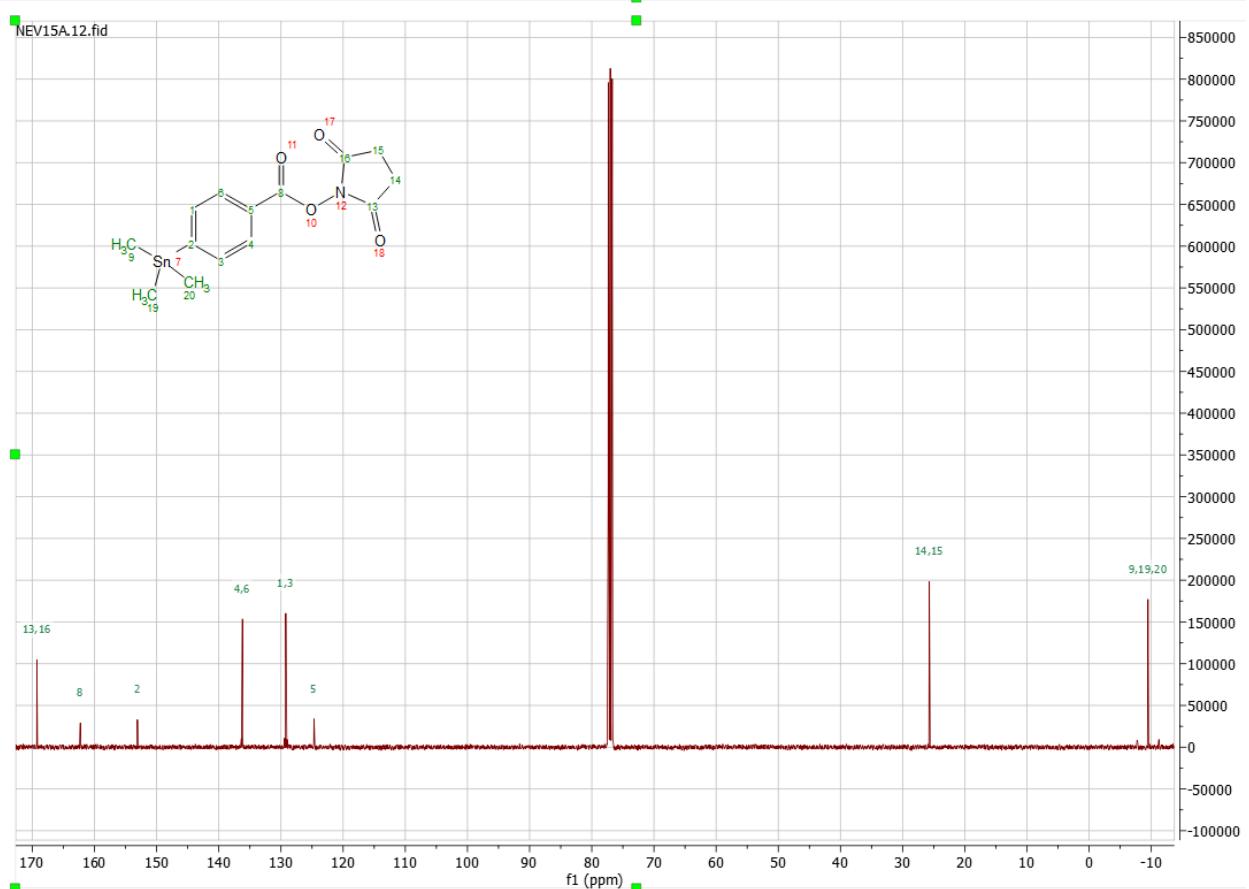
**Figure 33:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  du 4-iodobenzoate de succinimide (**1a**).



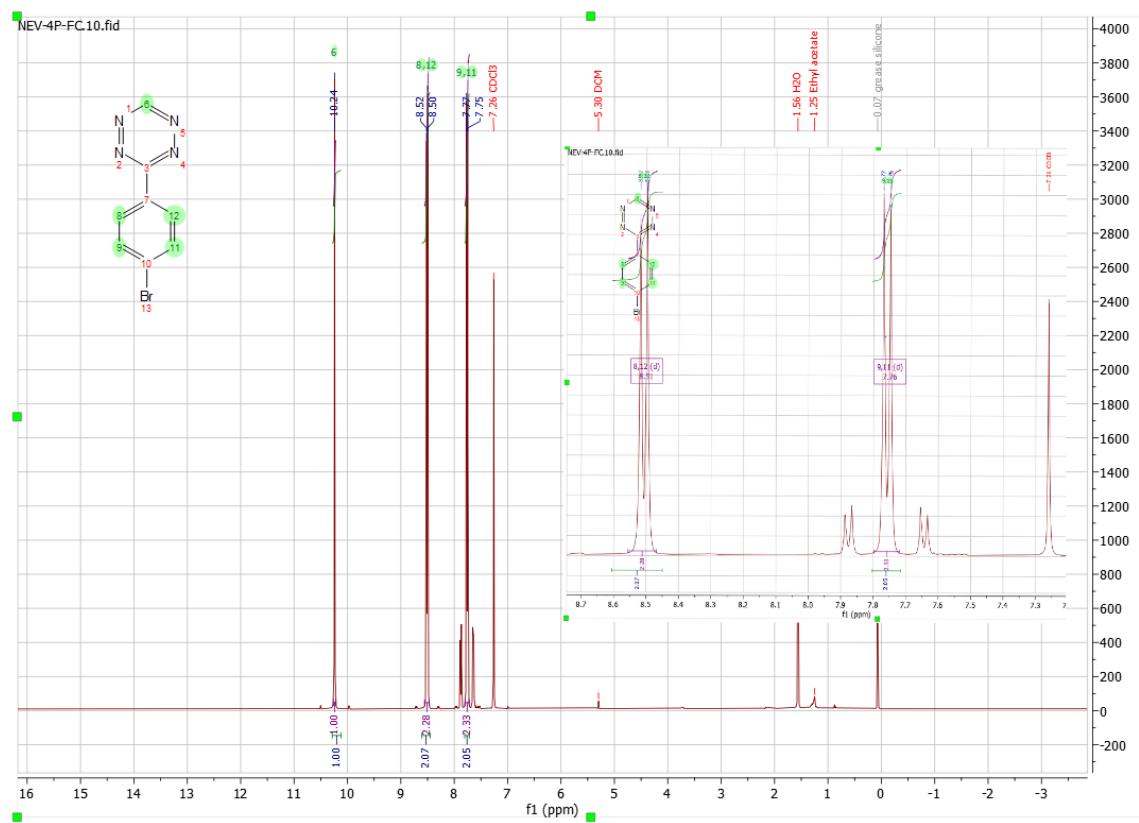
**Figure 34:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du 4-iodobenzoate de succinimide (**1a**).



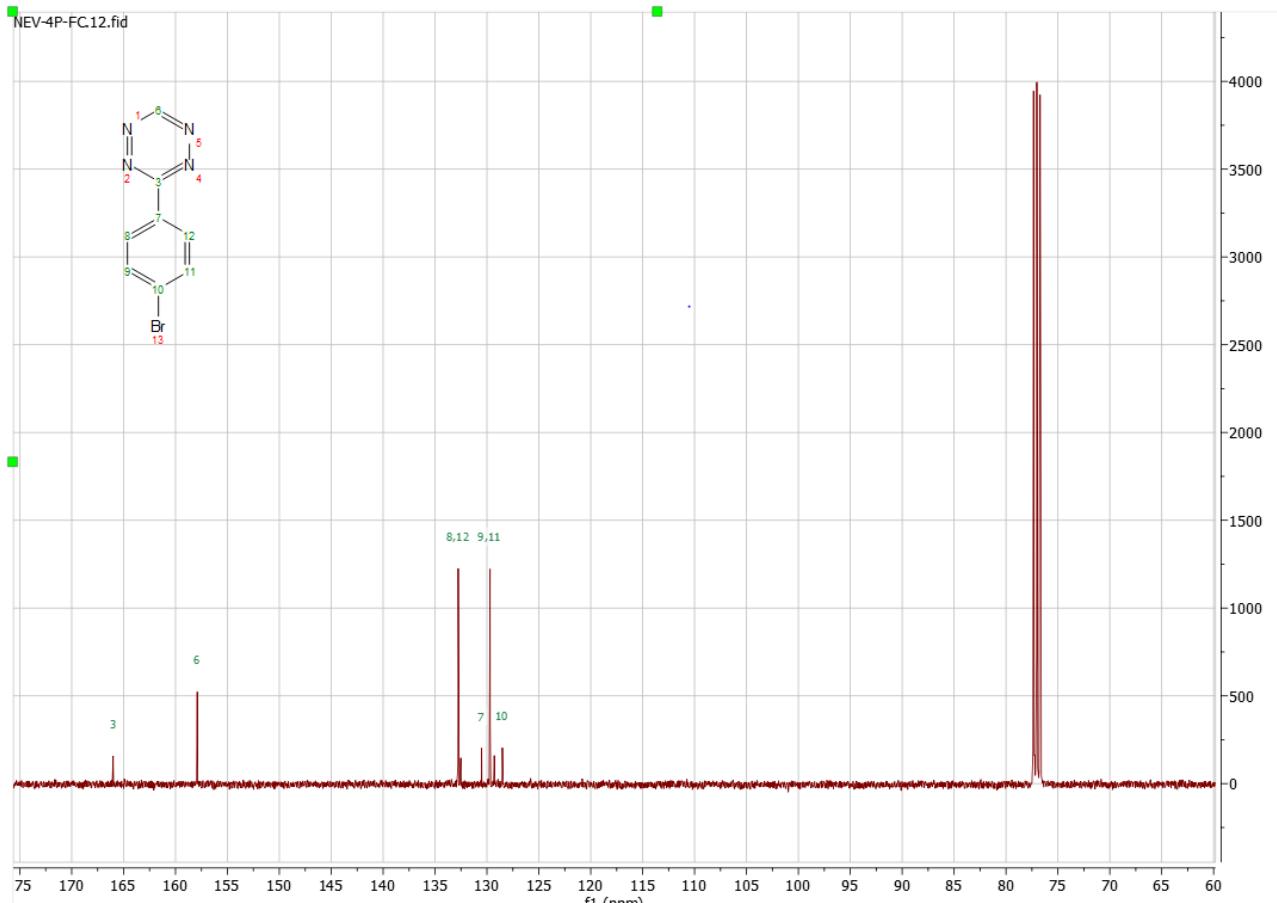
**Figure 35:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  du 4-triméthylstannylobenzoate de succinimide (**1**).



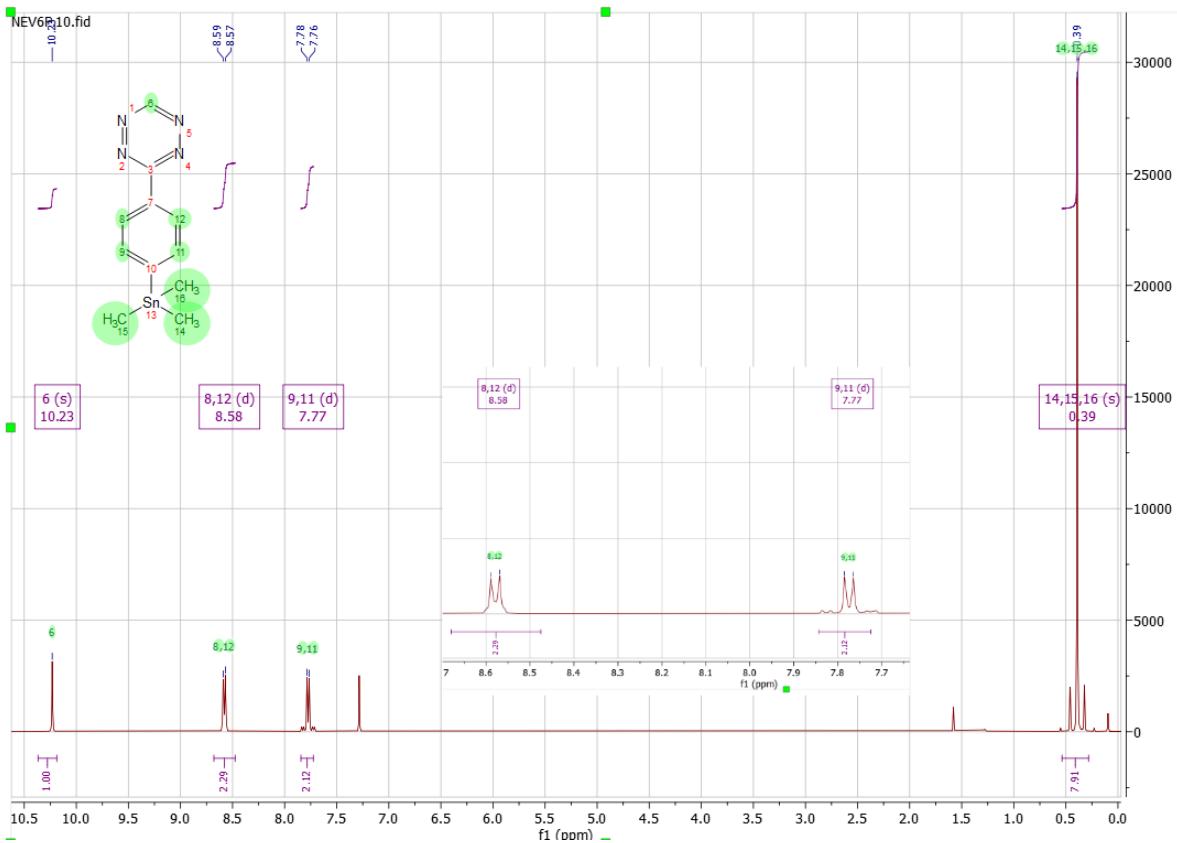
**Figure 36:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du 4-triméthylstannylobenzoate de succinimide (**1**).



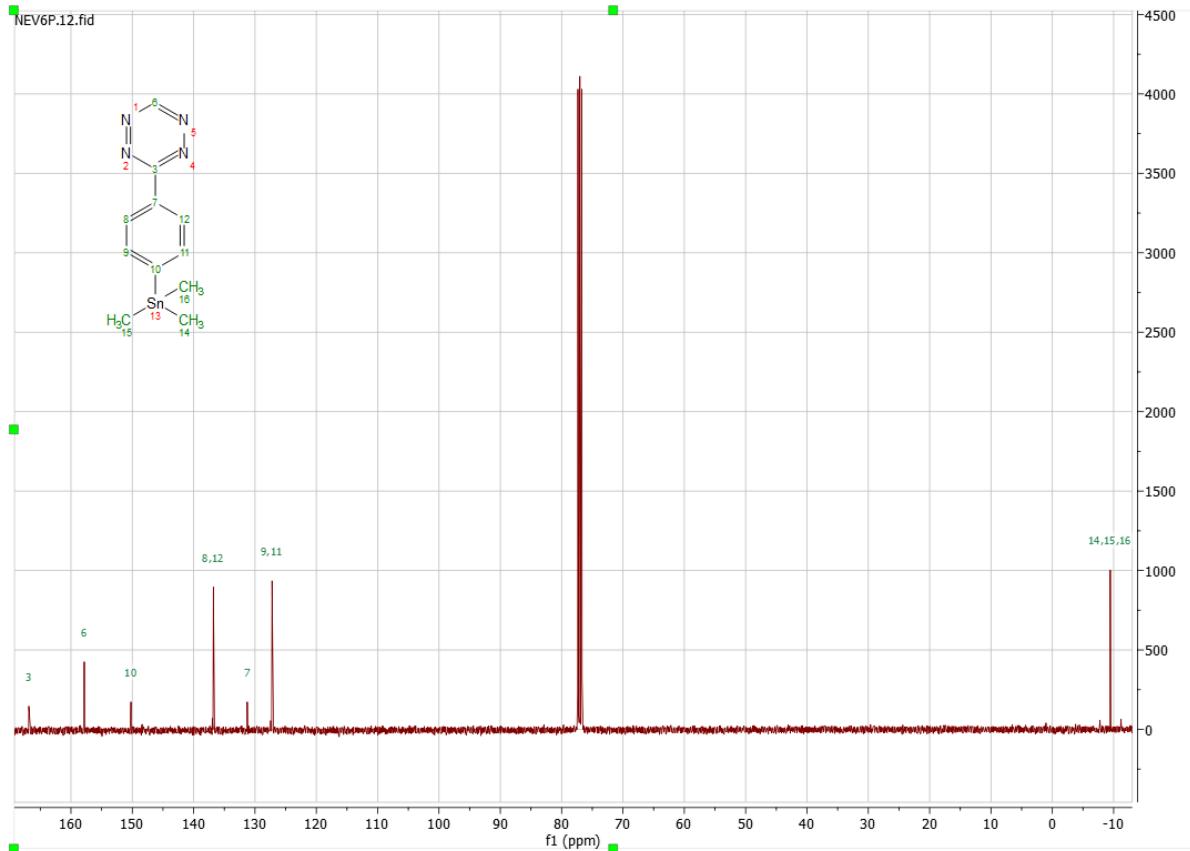
**Figure 37:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  du 3 - (4'-bromophényl) -1,2,4,5- tétrazine (**2a**).



**Figure 38:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  du 3 - (4'-bromophényl) -1,2,4,5- tétrazine (**2a**).



**Figure 39:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  du 3-phényl (4'- triméthylstannyl) -1,2,4,5- tétrazine (2).



**Figure 40:** Spectre RMN  $^1\text{H}$  du N-(2-maléimidoéthylamine) paratriméthylstannyl) (2).

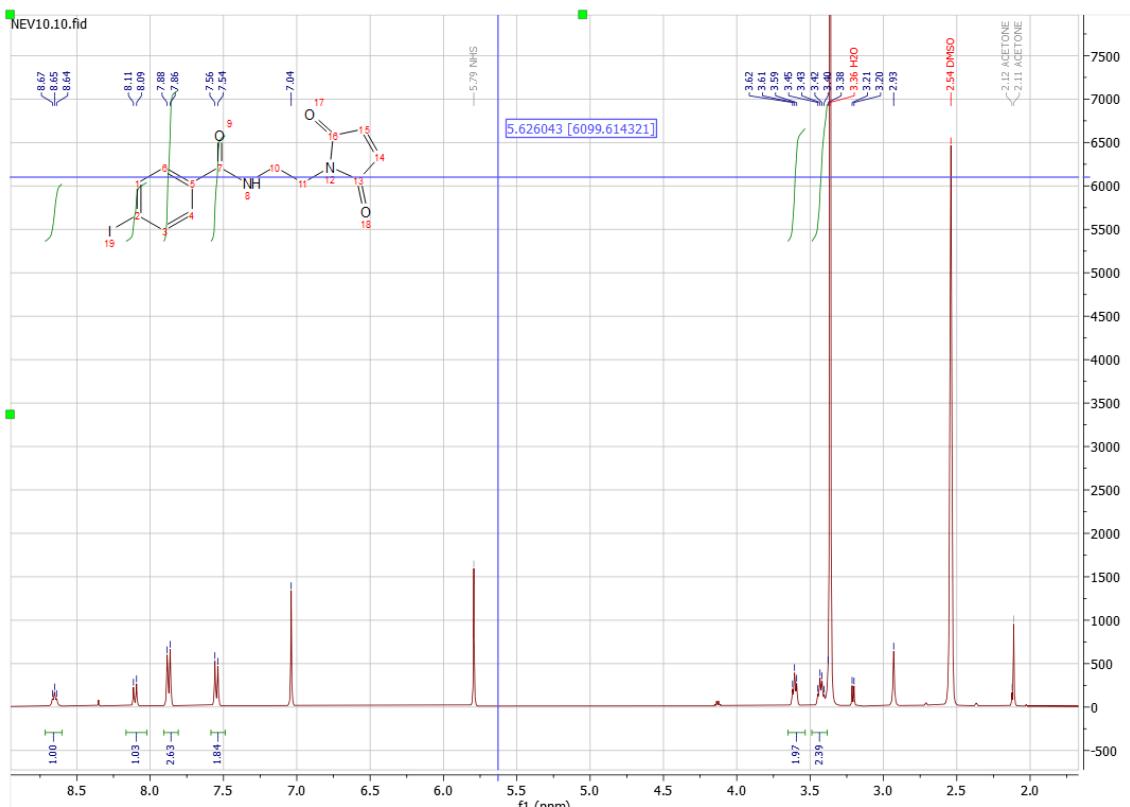
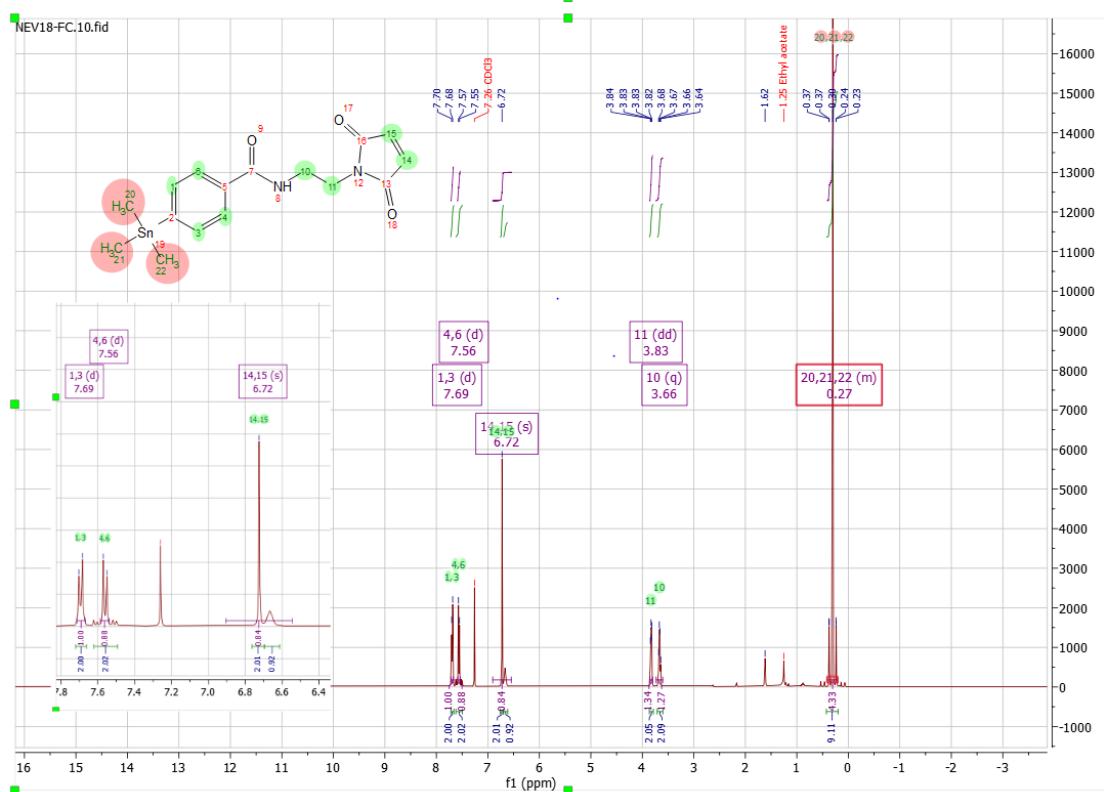
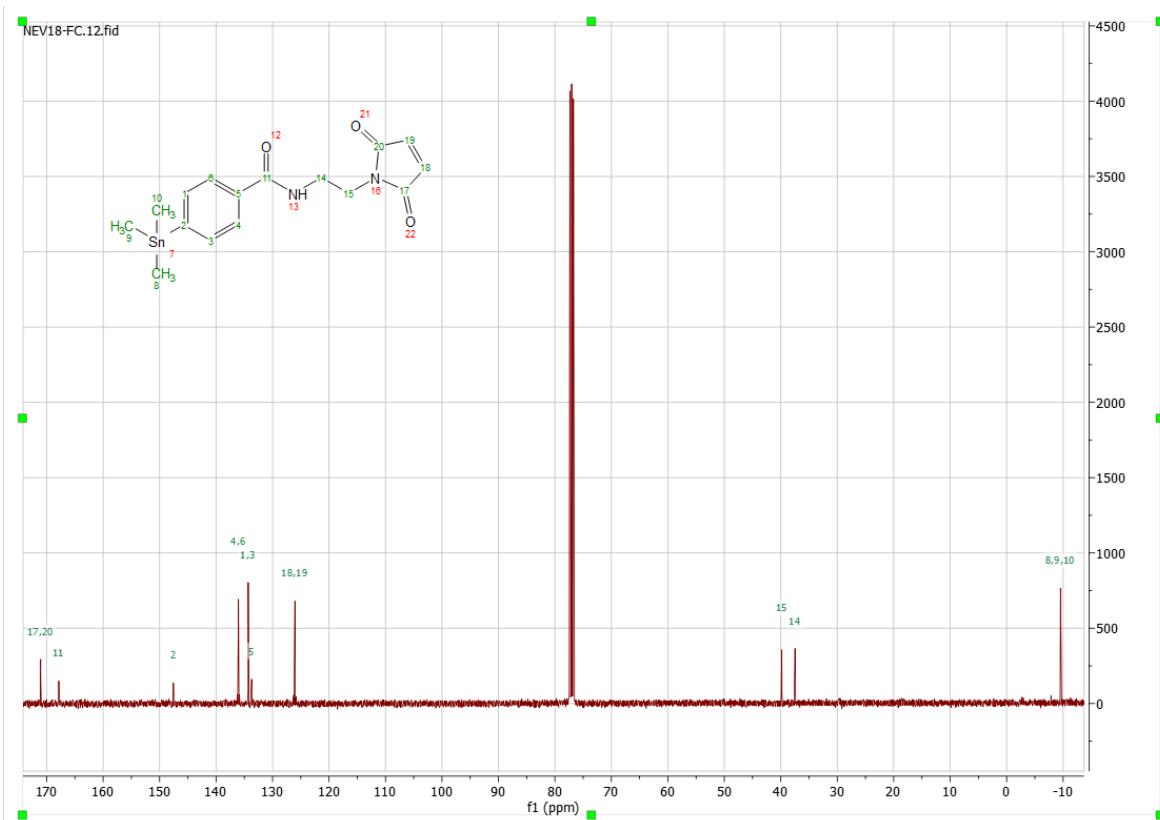
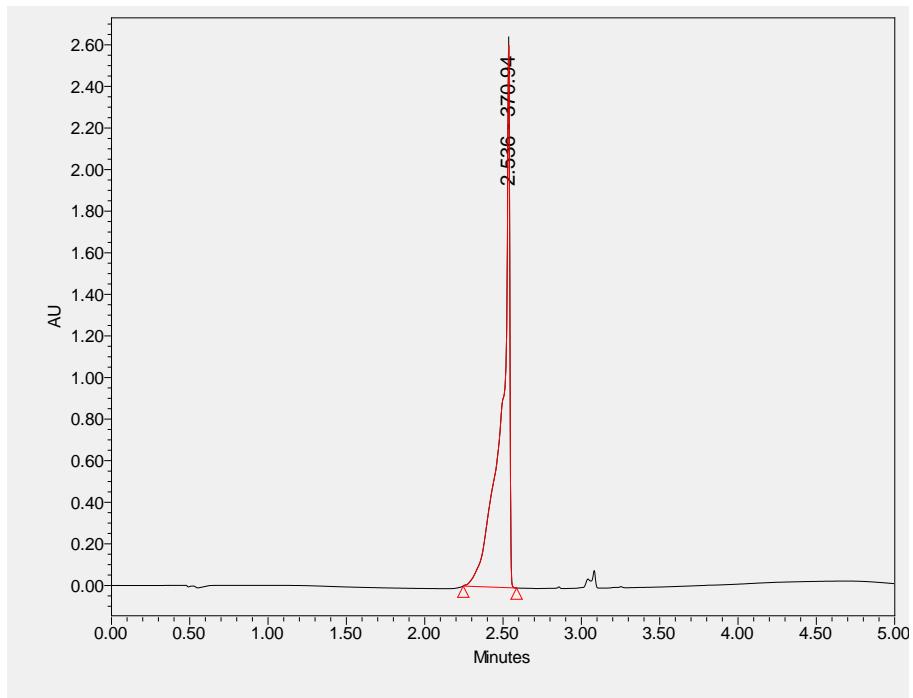


Figure 41: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du N-(2-maléimidoéthylamine) paraiodobenzylamide (3a).





**Figure 43:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du N-(2-maléimidoéthylamine) paratriméthylstannylbenzylamide (3).



**Figure 44:** Uplc du N-(2-maléimidoéthylamine) paraiodobenzylamide.

## 8 REFERENCES

1. Livre Blanc de la médecine nucléaire. *Médecine Nucléaire* **36**, 700–716 (2012).
2. Edwards, C. L. Tumor-localizing radionuclides in retrospect and prospect. *Seminars in Nuclear Medicine* **9**, 186–189 (1979).
3. Le bilan mondial du cancer s'alourdit, alors que les besoins en services augmentent | OPS/OMS | Organisation panaméricaine de la santé. <https://www.paho.org/fr/nouvelles/1-2-2024-le-bilan-mondial-du-cancer-salourdit-alors-que-les-besoins-services-augmentent> (2024).
4. *PET/CT in Lung Cancer*. (Springer International Publishing, Cham, 2018). doi:10.1007/978-3-319-72661-8.
5. R. Edelmann, M. Radiolabelling small and biomolecules for tracking and monitoring. *RSC Advances* **12**, 32383–32400 (2022).
6. Translational PET imaging research. *Neurobiology of Disease* **61**, 32–38 (2014).
7. Radiotracers. <https://www.iaea.org/topics/radiotracers> (2016).
8. Jacobson, O., Kiesewetter, D. O. & Chen, X. Fluorine-18 Radiochemistry, Labeling Strategies and Synthetic Routes. *Bioconjugate Chem.* **26**, 1–18 (2015).
9. Rong, J., Haider, A., Jeppesen, T. E., Josephson, L. & Liang, S. H. Radiochemistry for positron emission tomography. *Nat Commun* **14**, 3257 (2023).
10. Dreuille, O., Maszelin, P., Foehrenbach, H., Bonardel, G. & Gaillard, J.-F. Principe et technique de la tomographie par émission de positons (TEP). *Emc - Radiologie* **1**, 2–35 (2004).
11. Jacobson, O. & Chen, X. PET designated fluoride-18 production and chemistry. *Curr Top Med Chem* **10**, 1048–1059 (2010).
12. Piel, M., Vernaleken, I. & Rösch, F. Positron Emission Tomography in CNS Drug Discovery and Drug Monitoring. *J. Med. Chem.* **57**, 9232–9258 (2014).
13. Krishnan, H. S., Ma, L., Vasdev, N. & Liang, S. H. 18F-Labeling of Sensitive Biomolecules for Positron Emission Tomography. *Chemistry* **23**, 15553–15577 (2017).
14. Otaru, S. *et al.* Evaluation of Organo [18F]Fluorosilicon Tetrazine as a Prosthetic Group for the Synthesis of PET Radiotracers. *Molecules* **25**, 1208 (2020).

15. Barnes-Seeman, D., Beck, J. & Springer, C. Fluorinated compounds in medicinal chemistry: recent applications, synthetic advances and matched-pair analyses. *Curr Top Med Chem* **14**, 855–864 (2014).
16. Principe du cyclotron. <https://ressources.univ-lemans.fr/AccesLibre/UM/Pedago/physique/02/divers/cyclotron.html>.
17. Georges, C. Evaluation d'ylures d'iodonium et de sels d'uronium comme précurseurs de la synthèse de la para-[18F]fluorobenzylamine.
18. N°301-302 - octobre-novembre 2006 - L'Actualité Chimique, le journal de la SCF. *Société Chimique de France (SCF)* <https://new.societechimiquedefrance.fr/numero/n301-302-octobre-novembre-2006/>.
19. Dollé, F., Perrio, C. & Barré, L. Les molécules marquées au fluor-18.
20. Coenen, H. H. Fluorine-18 labeling methods: Features and possibilities of basic reactions. *Ernst Schering Res Found Workshop* 15–50 (2007) doi:10.1007/978-3-540-49527-7\_2.
21. Zeisler, S., Becker, D., Pavan, R., Moschel, R. & Rühle, H. A water-cooled spherical niobium target for the production of [18F]fluoride. *Applied radiation and isotopes : including data, instrumentation and methods for use in agriculture, industry and medicine* **53**, 449–53 (2000).
22. De la production du fluor 18 à l'imagerie TEP. <https://123dok.net/article/production-fluor-l-imagerie-tep.q76602ry>.
23. Sun, H. & DiMagno, S. G. Room-temperature nucleophilic aromatic fluorination: experimental and theoretical studies. *Angew Chem Int Ed Engl* **45**, 2720–2725 (2006).
24. Makaravage, K. J., Brooks, A. F., Mossine, A. V., Sanford, M. S. & Scott, P. J. H. Copper-Mediated Radiofluorination of Arylstannanes with [18F]KF. *Org. Lett.* **18**, 5440–5443 (2016).
25. IAEA. *Production and Quality Control of Fluorine-18 Labelled Radiopharmaceuticals*. (IAEA, Vienna, 2021).
26. Mossine, A. V. *et al.* Synthesis of [18F]Arenes via the Copper-Mediated [18F]Fluorination of Boronic Acids. *Org. Lett.* **17**, 5780–5783 (2015).
27. Sulfonium Salts as Leaving Groups for Aromatic Labelling of Drug-like Small Molecules with Fluorine-18. [https://www.researchgate.net/publication/275642085\\_Sulfonium\\_Salts\\_as\\_Leaving\\_Groups\\_for\\_Aromatic\\_Labelling\\_of\\_Drug-like\\_Small\\_Molecules\\_with\\_Fluorine-18](https://www.researchgate.net/publication/275642085_Sulfonium_Salts_as_Leaving_Groups_for_Aromatic_Labelling_of_Drug-like_Small_Molecules_with_Fluorine-18).

28. Direct Cu-mediated aromatic 18F-labeling of highly reactive tetrazines for pretargeted bioorthogonal PET imaging. *Chemical Science* **12**, 11668–11675 (2021).
29. C. Knight, J., Richter, S., Wuest, M., D. Way, J. & Wuest, F. Synthesis and evaluation of an 18 F-labelled norbornene derivative for copper-free click chemistry reactions. *Organic & Biomolecular Chemistry* **11**, 3817–3825 (2013).
30. Specklin, S., Caillé, F., Roche, M. & Kuhnast, B. 12 - Fluorine-18 radiolabeling of biologics. in *Fluorine in Life Sciences: Pharmaceuticals, Medicinal Diagnostics, and Agrochemicals* (eds. Haufe, G. & Leroux, F. R.) 425–458 (Academic Press, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-812733-9.00012-X.
31. Li, B.-Y. *et al.* SuFEx-enabled, chemoselective synthesis of triflates, triflamides and triflimidates. *Chem. Sci.* **13**, 2270–2279 (2022).
32. Carneiro, S. N. *et al.* Sulfur(vi) fluorides as tools in biomolecular and medicinal chemistry. *Org Biomol Chem* **21**, 1356–1372.
33. Wilson Lucas, S., Zijian Qin, R., Rakesh, K. P., Sharath Kumar, K. S. & Qin, H.-L. Chemical and biology of sulfur fluoride exchange (SuFEx) click chemistry for drug discovery. *Bioorganic Chemistry* **130**, 106227 (2023).
34. Nawaz, I., Nawaz, M., Shah Zaib Saleem, R. & Abbas Chotana, G. Sulfur (VI) Fluoride Exchange (SuFEx) via Glass-Assisted Organocatalysis. *Advanced Synthesis & Catalysis* **n/a**,.
35. Desmethyl SuFEx-IT: SO<sub>2</sub>F<sub>2</sub>-Free Synthesis and Evaluation as a Fluorosulfurylating Agent. *The Journal of Organic Chemistry* **89**, 3821–3833 (2024).
36. Zhou, H. *et al.* Introduction of a Crystalline, Shelf-Stable Reagent for the Synthesis of Sulfur(VI) Fluorides. *Org. Lett.* **20**, 812–815 (2018).
37. Meyer, J.-P., Adumeau, P., Lewis, J. S. & Zeglis, B. M. Click Chemistry and Radiochemistry: The First 10 Years. *Bioconjugate Chem.* **27**, 2791–2807 (2016).
38. Kumar, K. & Ghosh, A. 18F-AIF Labeled Peptide and Protein Conjugates as Positron Emission Tomography Imaging Pharmaceuticals. *Bioconjugate Chem.* **29**, 953–975 (2018).

39. Bird, R. E., Lemmel, S. A., Yu, X. & Zhou, Q. A. Bioorthogonal Chemistry and Its Applications. *Bioconjugate Chem.* **32**, 2457–2479 (2021).
40. Morris, O., Fairclough, M., Grigg, J., Prenant, C. & McMahon, A. A review of approaches to <sup>18</sup>F radiolabelling affinity peptides and proteins. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **62**, 4–23 (2019).
41. Mushtaq, S., Yun, S.-J. & Jeon, J. Recent Advances in Bioorthogonal Click Chemistry for Efficient Synthesis of Radiotracers and Radiopharmaceuticals. *Molecules* **24**, 3567 (2019).
42. Knight, J. C. & Cornelissen, B. Click Chemistry in Radiopharmaceutical Chemistry. in *Radiopharmaceutical Chemistry* (eds. Lewis, J. S., Windhorst, A. D. & Zeglis, B. M.) 467–479 (Springer International Publishing, Cham, 2019). doi:10.1007/978-3-319-98947-1\_26.
43. Krishnan, H. S., Ma, L., Vasdev, N. & Liang, S. H. <sup>18</sup>F-Labeling of Sensitive Biomolecules for Positron Emission Tomography. *Chemistry – A European Journal* **23**, 15553–15577 (2017).
44. Codelli, J. A., Baskin, J. M., Agard, N. J. & Bertozzi, C. R. Second-Generation Difluorinated Cyclooctynes for Copper-Free Click Chemistry. *J Am Chem Soc* **130**, 11486–11493 (2008).
45. Evaluation of an integrin  $\alpha$ v $\beta$ 6-specific peptide labeled with [18F]fluorine by copper-free, strain-promoted click chemistry. *Nuclear Medicine and Biology* **40**, 233–239 (2013).
46. Zhong, X. *et al.* Recent Advances in Bioorthogonal Click Chemistry for Enhanced PET and SPECT Radiochemistry. *Bioconjugate Chem.* **34**, 457–476 (2023).
47. Blackman, M. L., Royzen, M. & Fox, J. M. Tetrazine ligation: fast bioconjugation based on inverse-electron-demand Diels-Alder reactivity. *J Am Chem Soc* **130**, 13518–13519 (2008).
48. Li, Z. *et al.* Tetrazine–trans-cyclooctene ligation for the rapid construction of <sup>18</sup>F labeled probes. *Chem. Commun.* **46**, 8043–8045 (2010).
49. Tang, G., Zeng, W., Yu, M. & Kabalka, G. Facile synthesis of N-succinimidyl 4-[18F]fluorobenzoate ([18F]SFB) for protein labeling. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **51**, 68–71 (2008).

50. Nagachinta, S. *et al.* Fully automated 18F-fluorination of N-succinimidyl-4-[18F]fluorobenzoate ([18F]SFB) for indirect labelling of nanobodies. *Sci Rep* **12**, 18655 (2022).
51. Lacroix, S. *et al.* [<sup>18</sup> F]-FBEM, a tracer targeting cell-surface protein thiols for cell trafficking imaging. *Contrast Media & Molecular Imaging* **8**, 409–416 (2013).
52. Kiesewetter, D. O., Jacobson, O., Lang, L. & Chen, X. Automated Radiochemical Synthesis of [18F]FBEM: a Thiol Reactive Synthon for Radiofluorination of Peptides and Proteins. *Appl Radiat Isot* **69**, 410–414 (2011).
53. Thonon, D. *et al.* Fully automated preparation and conjugation of N-succinimidyl 4-[18F]fluorobenzoate ([18F]SFB) with RGD peptide using a GE FASTlab™ synthesizer. *Mol Imaging Biol* **13**, 1088–1095 (2011).
54. Cai, W., Zhang, X., Wu, Y. & Chen, X. A Thiol-Reactive 18F-Labeling Agent, N-[2-(4-18F-Fluorobenzamido)Ethyl]Maleimide, and Synthesis of RGD Peptide-Based Tracer for PET Imaging of  $\alpha$ v $\beta$ 3 Integrin Expression. *J Nucl Med* **47**, 1172–1180 (2006).
55. Coulson, D. R., Satek, L. C. & Grim, S. O. Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0). in *Inorganic Syntheses* (ed. Cotton, F. A.) vol. 13 121–124 (Wiley, 1972).
56. Sukhikh, T. S., Davydova, M. P. & Artem'ev, A. V. Crystal structure of tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0). *Mendeleev Communications* **33**, 171–173 (2023).
57. Carrasco, S. & Martín-Matute, B. Hydrazine-Free Facile Synthesis of Palladium-Tetrakis(Triphenylphosphine). *European Journal of Inorganic Chemistry* **2019**, 1951–1955 (2019).
58. Stille, J. K. The Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organotin Reagents with Organic Electrophiles [New Synthetic Methods (58)]. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **25**, 508–524 (1986).
59. Bickem, L. M., Gavriel, K. & Neumann, K. Accessing Functionalized Tetrazines as Click Chemistry Tools: A Synthesis Guide for Chemists and Chemical Biologists. *Eur J Org Chem* **27**, e202301117 (2024).
60. Qu, Y., Sauvage, F.-X., Clavier, G., Miomandre, F. & Audebert, P. Metal-Free Synthetic Approach to 3-Monosubstituted Unsymmetrical 1,2,4,5-Tetrazines Useful for Bioorthogonal Reactions. *Angewandte Chemie International Edition* **57**, 12057–12061 (2018).

61. Andersen, I. V., García-Vázquez, R., Battisti, U. M. & Herth, M. M. Optimization of Direct Aromatic 18F-Labeling of Tetrazines. *Molecules* **27**, 4022 (2022).
62. Ye, Y., Schimler, S. D., Hanley, P. S. & Sanford, M. S. Cu(OTf)<sub>2</sub>-Mediated Fluorination of Aryltrifluoroborates with Potassium Fluoride. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 16292–16295 (2013).