



HAL
open science

Marquage de molécules biologiques par des complexes de radiométaux à base de polyamines macrocycliques

Mathieu Moreau

► **To cite this version:**

Mathieu Moreau. Marquage de molécules biologiques par des complexes de radiométaux à base de polyamines macrocycliques. Autre. Université de Bourgogne, 2012. Français. NNT : 2012DIJOS016 . tel-00796881

HAL Id: tel-00796881

<https://theses.hal.science/tel-00796881>

Submitted on 5 Mar 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

Présentée

à l'UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

Mention : Chimie-Physique

Par

Mathieu MOREAU

Maître ès Sciences

***Marquage de molécules biologiques par des complexes de radiométaux
à base de polyamines macrocycliques***

Soutenue le 24 avril 2012 devant la commission d'examen

A. PÈLEGRIN	Directeur de Recherche à l'INSERM, Montpellier	Rapporteur
L. CHARBONNIÈRE	Directeur de Recherche au CNRS, Strasbourg	Rapporteur
O. TILLEMENT	Professeur à l'Université Claude Bernard, Lyon	Examineur
P. LE GENDRE	Professeur à l'Université de Bourgogne, Dijon	Examineur
F. BRUNOTTE	Professeur à l'Université de Bourgogne, Dijon	Directeur de Thèse
F. DENAT	Professeur à l'Université de Bourgogne, Dijon	Directeur de Thèse

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé à l'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (ICMUB), unité mixte de recherche entre l'Université de Bourgogne, et le Centre National de la Recherche Scientifique.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur André Pèlerin, Directeur de Recherches à l'INSERM à l'Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, ainsi qu'à Monsieur Loïc Charbonnière, Directeur de Recherches au CNRS à l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien de Strasbourg, pour avoir accepté la charge de rapporteurs de cette thèse.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Monsieur Olivier Tillement, Professeur au Laboratoire de Physico-Chimie des Matériaux Luminescents à Lyon, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie très sincèrement Monsieur Pierre Le Gendre, Professeur à l'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de participer à ce jury.

Que Monsieur le Professeur François Brunotte soit assuré de ma très grande reconnaissance pour avoir accepté de codiriger cette thèse, ainsi que pour le soutien qu'il m'a apporté durant ces quatre années.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Professeur Franck Denat, Directeur de l'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, pour avoir pris la direction de ma thèse pendant ces quatre années. Je le remercie pour avoir su me faire partager sa passion de la science, pour son enthousiasme, mais surtout pour la confiance et la liberté qu'il a su m'accorder durant toutes ces années passées au laboratoire.

Je remercie Frédéric Boschetti, PDG de la société CheMatech[®], pour la mise à disposition des précurseurs macrocycliques nécessaires à ce travail et pour l'aide et les conseils qu'il m'a apporté.

Les doutes et les questions scientifiques existentielles du doctorant ont pu être dissipés grâce à l'oreille attentive et aux conseils avisés de David Monchaud, ce pourquoi je lui exprime ma profonde reconnaissance. Je remercie également François Cuenot pour son aide et son soutien dans la gestion des projets.

Pour leur aide et leurs conseils concernant la spectrométrie de masse ou la RMN, je tiens à remercier Jean-Michel Barbe, Marie-José Penouilh-Suzette, et Fanny Chaux. Je remercie également Marcel Soustelle pour toutes les analyses élémentaires et les bricolages de génie.

De manière plus globale, mais non moins chaleureuse, je n'oublie pas d'associer mes remerciements à tous les membres de l'ICMUB et plus particulièrement de l'équipe P2DA (ex LIMRES, ex LIMSAG), permanents ou non, qui ont su rendre mon quotidien agréable.

Ce travail de thèse ne saurait exister sans la participation et le soutien des différents collaborateurs avec qui j'ai pu travailler.

J'adresse donc mes plus sincères remerciements à toutes les personnes du Centre régional de lutte contre le cancer G.-F. Leclerc avec qui j'ai été amené à travailler. Merci à Bertrand Collin pour sa sympathie et pour m'avoir initié aux joies de la radiochimie, à Jean-Marc Vrigneaud pour avoir su répondre à toutes mes questions concernant la radiophysique et surtout pour son calme à toute épreuve. Je remercie également Sylviane Prévot pour m'avoir sensibilisé aux risques liés aux différents radioéléments, et Alexandra Nicolas qui m'a été longtemps indispensable lors de mes séjours au CGFL, tant pour son implication que pour son soutien moral et sa bonne humeur.

Je tiens à remercier les personnes de la société Oncodesign[®] qui m'ont permis de mener à bien ce travail de thèse. Merci surtout à Olivier Raguin pour son soutien, son implication et sa patience durant tout le temps que nous avons passé à "ramer" avec les cellules et les souris.

Je remercie également David Vandroux, PDG de la société NVH-medicinal[®], ainsi que Jean-Pascal Gimeno et Laure Dumont, pour leurs conseils, leur disponibilité et leur aide au cours de notre collaboration. Je tiens à remercier Emmanuel De Maistre pour son aide et ses conseils dans le domaine de l'hémostase. Merci à Vanessa pour sa joie de vivre et sa bonne humeur inébranlables, pour ses "Oh ben lol !" inoubliables...

Je n'oublie pas de remercier les membres du laboratoire INSERM "Lipides, Nutrition, Cancer", notamment Vincent Duheron qui a su s'ouvrir au monde de la chimie tout biologiste qu'il est, tout en m'expliquant clairement et sereinement les subtilités de la biologie. Merci également à Laurent Lagrost et Wahib Sali pour leur aide et leurs explications avisées.

Certains travaillent avec des collègues, j'ai eu pour ma part le bonheur de pouvoir travailler avec des amis. Tout particulièrement, je souhaite remercier avec la plus grande sincérité Clairou et Paulette pour m'avoir supporté pendant si longtemps, pour leur aide et leur soutien dans les moments plus difficiles, et pour leur bonne humeur. Je tiens également à remercier Pépito Nicolas Sok pour ses blagues inoubliables et son optimisme sans égal, et Yoann Rousselin pour m'avoir donné goût à la chimie il y a déjà sept ans.

J'adresse également un immense merci à tout mes autres amis/collègues du labo R13 et des soirées houblonnées, Monkieur Paulin, MarieJo (bis), Fougasse, Sophie V., Beber pour qui je n'aurai pas pu placer "préhistorique", Marco, Loïc, Stéphane, Yulia, Toinou, Frédérique, Semra, Benoît, Biquet, Yann, Clément, Julien, Pawel, Maryline, Nicolas W., Romain, Sophie P., Marine... À tous ceux que j'ai oublié de citer, merci.

Merci aussi aux non chimistes, mais non moins amis qui m'ont permis de m'aérer l'esprit quand j'en avais besoin : Kévous, Flo, Fab&Claire, Perrine&Fabien, les badistes (Didj en premier), et là je suis sûr d'en avoir oublié...

Je remercie bien entendu ma famille et en premier lieu mes parents pour m'avoir laissé choisir mon chemin ainsi que pour leur soutien durant ces huit années d'études. Merci à Nico Céline & Sacha, David Blandine & Château, à mes grands-parents, à ma petite Juj'bar et à ma belle famille, pour tous les bons moments passés en leur compagnie qui m'ont permis d'avancer sans perdre de vue les choses essentielles de la vie.

Enfin, même si les mots ne suffisent plus, merci Sophie.

TABLE DES MATIÈRES

NOTATIONS ET ABRÉVIATIONS	9
AVANT PROPOS	11
I. INTRODUCTION	15
I.1 UN APERÇU DES DIFFÉRENTES TECHNIQUES D'IMAGERIE MÉDICALE	15
I.1.1 <i>Les rayons X et la tomodynamométrie</i>	<i>16</i>
I.1.2 <i>L'échographie</i>	<i>17</i>
I.1.3 <i>L'imagerie optique</i>	<i>17</i>
I.1.4 <i>L'Imagerie par Résonance Magnétique</i>	<i>17</i>
I.1.5 <i>L'imagerie nucléaire</i>	<i>19</i>
I.2 UN APERÇU DES VECTEURS MACROMOLÉCULAIRES EN IMAGERIE MÉDICALE	34
I.2.1 <i>Généralités</i>	<i>34</i>
I.2.2 <i>Les anticorps en médecine nucléaire</i>	<i>38</i>
I.3 LES AGENTS BIFONCTIONNELS CHÉLATANTS EN MÉDECINE NUCLÉAIRE	41
I.3.1 <i>Les fonctions de greffage pour la bioconjugaison</i>	<i>42</i>
I.3.2 <i>Choix de l'agent chélatant : l'intérêt des polyazamacrocycles</i>	<i>47</i>
I.3.3 <i>Fonctionnalisation des polyazamacrocycles pour la bioconjugaison</i>	<i>53</i>
I.4 PRÉSENTATION DE PHARM'IMAGE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE	58
II. SYNTHÈSE D'AGENTS CHÉLATANTS BIFONCTIONNELS À BASE DE POLYAMINES MACROCYCLIQUES	63
II.1 INTRODUCTION D'UNE FONCTION ANHYDRIDE CYCLIQUE	63
II.2 SYNTHÈSE DU SYSTÈME DOTAGA-ANHYDRIDE	64
II.3 SYNTHÈSE DE PRÉCURSEURS BIMODAUX	69
II.3.1 <i>Synthèse d'un dérivé DOTA-fluorescéine anhydride</i>	<i>69</i>
II.3.2 <i>Introduction d'autres fonctions de greffage</i>	<i>77</i>
II.4 CONCLUSION	81
III. GREFFAGE ET MARQUAGE DE MOLÉCULES BIOLOGIQUES POUR L'IMAGERIE CIBLÉE	85
III.1 MARQUAGE DU TRASTUZUMAB ET DU CÉTUXIMAB : NOUVEAUX TRACEURS POUR L'IMAGERIE VECTORISÉE EN ONCOLOGIE	85
III.1.1 <i>Mise au point des conditions expérimentales</i>	<i>85</i>
III.1.2 <i>Marquage du trastuzumab</i>	<i>89</i>
III.1.3 <i>Marquage du cétuximab</i>	<i>106</i>
III.2 GREFFAGE D'AGENTS CHÉLATANTS BIFONCTIONNELS SUR L'ABCIXIMAB	113
III.2.1 <i>L'abciximab : état de l'art</i>	<i>113</i>
III.2.2 <i>Greffage de dérivés du DOTA sur l'abciximab</i>	<i>116</i>
III.2.3 <i>Greffage multi-étape du DOTAGA-anhydride</i>	<i>126</i>
III.3 MARQUAGE DE LPS : APPLICATION À L'IMAGERIE BIMODALE	134

III.3.1	<i>Généralités concernant les LPS</i>	134
III.3.2	<i>Marquage de LPS par le système bimodal DOTA-Bodipy-NCS</i>	135
III.4	CONCLUSION	141
	CONCLUSION GÉNÉRALE	143
	PARTIE EXPÉRIMENTALE	147
	INSTRUMENTATION	149
	SYNTHÈSE D'AGENTS CHÉLATANTS BIFONCTIONNELS À BASE DE POLYAMINES MACROCYCLIQUES	150
	MARQUAGE D'ANTICORPS MONOCLONAUX	160
	GREFFAGE D'AGENTS CHÉLATANT BIFONCTIONNELS SUR L'ABCIXIMAB	169
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	179
	COMMUNICATION DES RÉSULTATS	197

NOTATIONS ET ABRÉVIATIONS

- Asp** : Acide aspartique
BSA : Bovine Serum Albumin
CE : Capture Électronique
COSY : COrrélation SpectroscopY
CPK : Coray, Pauling, Koltun
Cys : Cystéine
DCC : DicyClohexylCarbodiimide
DIPEA : *N,N*-diisopropylethylamine
DMF : Diméthylformamide
DMSO : 4-Diméthylsulfoxyde
DOTA : 2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tétrayl)tétracétique acid
DTPA : Diéthylène-triamine-pentaacétique acid
EDCI : 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDTA : Ethylène-diamine-tétracétique acid
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
ESI : Electrospray Ionization
FDG : Fluorodéoxyglucose
FITC : FluoresceinIsoThioCyanate
FPLC : Fast Protein Liquid Chromatography
Glu : Acide glutamique
HER : Human Epidermal growth factor Receptor
HBTU : O-Benzotriazole-*N,N,N',N'*-tetraméthyluronium hexafluorophosphate
HMBC : Hétéronucléaire Multiple Quantum Coherence
HMQC : Hétéroatome Multiple-Bond Correlation
HOBt : Hydroxybenzotriazole
HPLC : High-Performance Liquid Chromatography
IR : InfraRouge
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
ITLC : Instant Thin Layer Chromatography
Lys : Lysine
MALDI-TOF : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight
NCS : isothiocyanate
NHS : *N*-hydroxysuccinimide

NOESY : Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy

NOTA : 2,2',2''-(1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triyl)triacetic acid

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

PBS : Phosphate Buffer Saline

PLTP : PhosphoLipid-Transfer Protein

SPIO : SuperParamagnetic Iron Oxide

TDM : Tomodensitométrie

TEMP : Tomographie d'Émission MonoPhotonique

TEP : Tomographie par Émission de Positons

TETA : 2,2',2'',2'''-(1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-1,4,8,11-tetrayl)tetraacetic acid

TFA : Trifluoroacetic acid

TIPS : Triisopropylsilane

TRITA : 2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-tetraazacyclotridecane-1,4,7,10-tetrayl)tetraacetic acid

TOC : [D-Phe¹, Tyr³]-Octréotide

Tyr : Tyrosine

UV : Ultra Violet

USPIO : Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide

AVANT PROPOS

En 1895, la découverte de la radiographie par rayons X a constitué le premier pas de l'imagerie médicale. Depuis, de nouvelles techniques plus précises, plus informatives, ou simplement complémentaires ont vu le jour, permettant au corps médical d'explorer et de mieux comprendre le corps humain. Si la médecine permet aujourd'hui un diagnostic précis des différentes maladies, elle le doit pour une grande part aux avancées réalisées dans le domaine des mathématiques et de la physique, mais également en chimie. En effet, là où les mathématiques et la physique apportent généralement la technologie permettant la différenciation de tissus (imagerie structurelle ou anatomique), la chimie permet d'apporter, notamment par l'utilisation d'agents de contraste ou de sondes imageantes, une meilleure visualisation voire un ciblage de pathologies caractéristiques d'une maladie (imagerie fonctionnelle). L'imagerie médicale, avec 5 milliards d'exams à travers le monde chaque année (70 millions en France), est cependant loin d'avoir atteint ses limites.

Les progrès technologiques d'aujourd'hui sont appelés à devenir les techniques de demain. Dans ce contexte, il est important de développer des outils adaptés à une médecine de plus en plus personnalisée. L'imagerie moléculaire entre sans aucun doute dans cette catégorie d'imagerie optimisée pour les patients présentant des pathologies bien définies. Bien plus qu'un outil d'aide au diagnostic, l'imagerie moléculaire permet également la validation de traitements et le suivi thérapeutique des patients. Dans de nombreux domaines, comme la cancérologie ou la cardiologie, l'imagerie nucléaire constitue une technique de choix pour la détection de pathologies précises. L'administration d'une substance faiblement radioactive couplée à un vecteur biologique permet en effet de cibler précisément une zone cancéreuse.

Si certains de ces traceurs sont largement utilisés et approuvés, de nombreuses améliorations peuvent encore être apportées dans la conception de ces molécules. En effet, l'utilisation d'anticorps permet aujourd'hui un ciblage bien plus spécifique des zones d'intérêt, mais l'ajout d'un élément radioactif reste une étape délicate dont la maîtrise est encore un défi. Il est crucial de conserver le caractère spécifique de la molécule vectrice utilisée. De plus, une bonne connaissance des propriétés physicochimiques du radioélément est nécessaire afin de prévenir tout risque d'irradiation non contrôlée. Ce travail de thèse qui s'inscrit dans le cadre du projet d'imagerie préclinique Pharm'Image[®], porte notamment sur la conception et la mise en œuvre de nouveaux traceurs pour l'imagerie radioisotopique vectorisée. Le développement et l'utilisation d'agents multimodaux monomoléculaires pour l'imagerie nucléaire et l'imagerie optique seront également abordés dans ce manuscrit.

Chapitre I :

Introduction

I. Introduction

Depuis la découverte des rayons X par W. Röntgen en 1895, le domaine de l'imagerie médicale n'a eu de cesse de se développer, apportant aux médecins quantité d'informations pour la compréhension du corps humain et des processus biologiques qui y sont liés. Aujourd'hui, l'imagerie médicale est avant tout un outil de diagnostic, permettant de pronostiquer différentes pathologies conduisant ainsi à la prescription d'un traitement adapté. Elle est également de plus en plus sollicitée dans le domaine de la recherche médicale clinique ou préclinique afin de comprendre certains phénomènes physiopathologiques, ou encore pour le suivi de traitements.

On distingue deux types d'imageries médicales : l'imagerie structurelle (ou anatomique) permet d'obtenir des informations sur l'anatomie des organes (taille, volume, localisation, forme d'une éventuelle lésion, etc.), tandis que l'imagerie fonctionnelle nous informe sur leur fonctionnement (physiologie, métabolisme, etc.). Les nouvelles techniques d'imagerie fonctionnelle permettent par exemple de relier une région du cerveau à une activité ou une sensation précise, ou encore d'explorer le fonctionnement de processus physiologiques à l'échelle moléculaire. Ce dernier exemple ouvre la porte à un type d'imagerie émergent appelé imagerie moléculaire, qui consiste en l'étude de processus biologiques à l'échelle cellulaire ou subcellulaire chez des sujets vivants. L'imagerie moléculaire est susceptible entre autres d'accélérer le développement de nouvelles molécules thérapeutiques grâce à des tests précliniques et cliniques.

Ce chapitre présentera tout d'abord les différentes techniques d'imagerie médicale, en prenant soin de développer leurs avantages et leurs inconvénients. Il s'intéressera plus précisément à leur potentiel pour l'imagerie moléculaire. Notre objectif nous a conduit à détailler plus particulièrement l'imagerie nucléaire.

Nous verrons que cette technique nécessite l'utilisation d'une molécule émettrice d'un signal à l'intérieur d'un tissu ou d'une cellule exprimant une cible d'intérêt (notion de marquage). Ainsi, ce chapitre se focalisera plus particulièrement sur la notion de vectorisation de marqueurs radioactifs en imagerie nucléaire par l'intermédiaire d'un agent dit chélatant bifonctionnel, en prenant soin de présenter quelques exemples d'applications. Certains points de cette introduction seront analysés et présentés plus finement dans les chapitres appropriés.

I.1 Un aperçu des différentes techniques d'imagerie médicale

Les techniques d'imagerie médicale sont dites non invasives lorsqu'elles n'engendrent aucune lésion (biopsie, endoscopie...). Le principe de tous ces systèmes repose sur l'utilisation d'un rayonnement électromagnétique interagissant avec la matière afin de fournir les informations

désirées. La radiographie s'appuie sur l'utilisation des rayons X, l'échographie fait appel aux ultrasons, l'imagerie optique utilise des radiations électromagnétiques situées dans les domaines du visible et du proche infra-rouge, tandis que les techniques de scintigraphie sont basées sur la détection de rayonnement gamma.

1.1.1 Les rayons X et la tomодensitométrie

La radiographie par rayons X découverte en 1895 par W. Röntgen est considérée comme la plus ancienne technique d'imagerie médicale, et valut au physicien allemand le prix Nobel de physique en 1901. Cette technique est basée sur la différence d'atténuation des photons X par les tissus biologiques et fournit essentiellement des informations d'ordre anatomique. La radiographie X reste la technique d'imagerie anatomique la plus utilisée.

La tomодensitométrie (TDM) ou scanner (CT) a été une véritable révolution dans l'usage des rayons X. Cette technique a tiré profit des avancées technologiques (informatique, capteurs) pour fournir des informations plus précises. En effet, elle permet une reconstruction en 2D ou 3D des structures anatomiques, tout en générant des images mieux contrastées (Figure I-1). L'utilisation d'agents de contraste iodés peut être envisagée, notamment dans le domaine de l'angiographie (angioscanner, scanner coronaire, etc.). La TDM induit cependant une forte exposition aux rayons X, et chaque indication d'examen doit donc être soigneusement pesée suivant le bénéfice attendu.

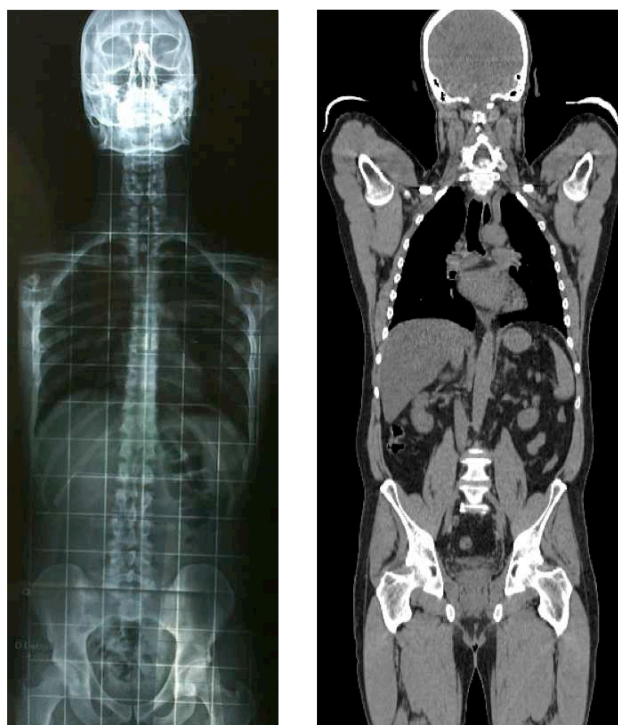


Figure I-1 : Comparaison d'un cliché radiographique (gauche) et d'une coupe coronale tomодensitométrie (droite).

1.1.2 L'échographie

L'échographie est l'une des techniques d'imagerie les plus couramment utilisées en clinique. Cette modalité, basée sur l'émission et la réception d'un signal ultrasonore, permet essentiellement de visualiser les tissus, mais peut également être utilisée en imagerie fonctionnelle pour la mesure de vitesses sanguines. Bien que la qualité de l'image soit très dépendante du manipulateur, l'échographie présente de nombreux avantages, tels que sa simplicité et sa rapidité d'utilisation, mais surtout son innocuité totale (absence de radiations ionisantes) pour le patient.¹ Ainsi, l'imagerie par ultrasons reste la technique de choix lors d'examen de grossesse, mais joue également un rôle non négligeable pour la validation de traitements ou le suivi de thérapie.^{2,3}

1.1.3 L'imagerie optique

L'imagerie optique repose sur la détection de rayonnements non ionisants dans le domaine du visible et de l'infra-rouge (400 - 1500 nm) et son utilisation en milieu clinique se limite à la détection d'une coloration de la peau, de la langue, ou des yeux à un niveau macroscopique. De nombreuses techniques d'imagerie optique existent, notamment la bioluminescence, la phosphorescence, ou encore la fluorescence. Les techniques optiques offrent la possibilité d'un suivi en temps réel de processus biologiques au sein d'un organisme vivant de façon non invasive. Cette modalité fait partie des plus sensibles (jusqu'à $\sim 10^{-15}$ M) et des moins coûteuses pour imager avec une très bonne résolution des cellules ou des tissus sur le petit animal.⁴ Elle présente malheureusement quelques limitations, telles qu'une faible profondeur de pénétration du rayonnement d'excitation, ainsi qu'une autofluorescence des tissus dans le domaine du visible, conduisant à des rapports signal sur bruit très faibles. Cependant, l'imagerie optique, notamment par fluorescence, connaît un fort développement dans le domaine de l'imagerie préclinique, bien entendu pour des études *in vitro* mais également de plus en plus pour l'imagerie *in vivo* du petit animal. En effet, le développement de nouveaux appareils plus sensibles, ainsi que la synthèse de nouvelles sondes fluorescentes émettant dans le proche IR ont permis l'obtention d'images de très bonne résolution mettant en évidence des phénomènes physiopathologiques de première importance.^{5,6}

1.1.4 L'Imagerie par Résonance Magnétique

Tout comme le scanner X, l'Imagerie par Résonance Magnétique est une technique tomographique, mais n'utilise pas de rayonnement ionisant. Le principe de la résonance magnétique est basé sur le phénomène de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) découvert par F. Bloch et E. M. Purcell en 1946. Depuis l'acquisition des premières images par résonance magnétique nucléaire

en 1973, l'IRM est devenue une technique majeure de l'imagerie médicale, en témoignent les quelques 60 millions d'examens cliniques réalisés chaque année dans le monde.

L'IRM, contrairement aux techniques d'imagerie optique ou nucléaire, est relativement peu sensible (10^{-3} - 10^{-4} M). Les examens IRM s'appuient sur les propriétés magnétiques des noyaux d'hydrogène (protons) des molécules d'eau, du fait de l'abondance de l'eau dans les tissus biologiques. L'application d'un champ magnétique statique extérieur (champ de 0,5 à 3 T couramment utilisé en milieu hospitalier) permet d'observer les protons des molécules d'eau présentes dans l'organisme. De ce fait, l'intensité de l'image varie selon l'abondance (ou la densité locale) des molécules d'eau. Ainsi, dans son utilisation la plus basique, l'IRM fournit des informations anatomiques du corps humain. La polyvalence et l'unicité de l'IRM proviennent du fait que les propriétés RMN du proton varient en fonction de son microenvironnement physicochimique, et que l'IRM peut être adaptée afin d'exploiter ces propriétés et obtenir des informations physiopathologiques. Par exemple, un processus lésionnel aigu s'accompagne généralement de phénomènes inflammatoires entraînant une augmentation de la concentration en eau dans ces tissus, et sera aisément détectable en IRM.

Comme nous l'avons dit précédemment, et malgré une résolution spatiale excellente, l'IRM est une technique peu sensible, et il est souvent nécessaire de réaliser une acquisition longue (environ 20 min) afin d'obtenir une image interprétable. Pour accroître le contraste entre les tissus, une des solutions mise en œuvre consiste à administrer au patient un agent de contraste afin de mieux visualiser les zones d'intérêt. L'efficacité de l'agent de contraste est définie par sa relaxivité, c'est-à-dire sa capacité à accélérer les vitesses de relaxation des molécules d'eau dans son entourage. De nos jours, 30 à 40 % des images sont enregistrées après injection d'un agent de contraste, et il est indéniable que le développement de ces derniers a largement contribué aux avancées spectaculaires de l'IRM ces dernières années. Depuis les premiers agents introduits en 1988 aux Etats-Unis et en France, plusieurs millions de doses ont été vendues à travers le monde.

De nombreux agents de contraste ont été développés ces dernières années, et plusieurs sont actuellement commercialisés (agents extracellulaires et intracellulaires). Les agents de contraste actuels sont à 95 % à base de chélates de gadolinium Gd(III), élément hautement paramagnétique capable de réduire les temps de relaxation des protons des molécules d'eau avoisinantes avec une grande efficacité.⁷⁻⁹ Ces agents dits de première génération permettent d'améliorer nettement le diagnostic médical. Le gadolinium étant très toxique sous sa forme libre, il doit être injecté sous forme de complexe stable et inerte dans l'organisme. Allier efficacité et innocuité de l'agent de contraste est donc un enjeu de premier ordre lors du développement de telles molécules. La Figure I-2 représente deux clichés IRM du cerveau d'un patient sans et avec agent de contraste (respectivement cliché de gauche et de droite). La tumeur située au milieu de l'hémisphère droit est clairement observée grâce à une prise de contraste "positive" après injection d'un agent de contraste

à base de gadolinium. Notons que des agents de contraste superparamagnétiques dits “négatifs” constitués de nanoparticules d’oxyde de fer (SPIO, USPIO) sont également utilisés.¹⁰

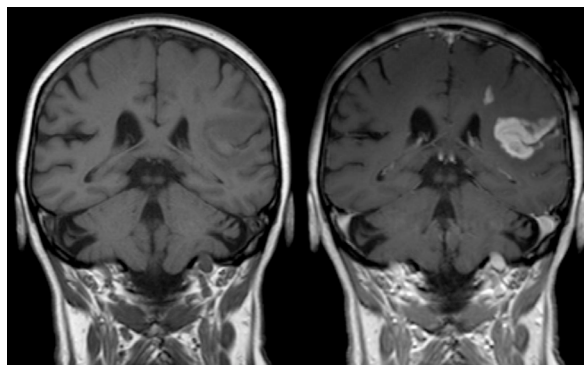


Figure I-2 : Exemple de clichés IRM avant (gauche) et après (droite) injection d'un agent de contraste à base de gadolinium.¹¹

Les efforts se sont donc portés ces dernières années sur l’amélioration des performances des agents de contraste en optimisant les propriétés de relaxation du complexe de gadolinium (“design” du ligand, contrôle des paramètres influant sur la relaxivité...).¹² Le développement de nouveaux systèmes de type nanoparticules¹³ ou dendrimères^{14,15} composés de plusieurs chélates de gadolinium, permet d’augmenter la sensibilité.

De nouvelles familles d’agents de contraste dits bioactivables ou “intelligents” sont actuellement développées. Le signal émis est alors directement influencé par leur environnement (réponse magnétique spécifique à l’évènement moléculaire visé). Ces agents, activés par une enzyme, un cation métallique (ex : Ca^{2+}) ou une variation de pH, devraient permettre la mise en évidence et la localisation de cellules cancéreuses.¹²

1.1.5 L’imagerie nucléaire

L’imagerie nucléaire consiste en l’injection dans l’organisme d’un composé (biomolécule, médicament, etc.) faiblement radioactif dont la localisation est par la suite déterminée par un système de détection approprié selon la nature du rayonnement émis. Son champ d’action est principalement focalisé sur le suivi de molécules ciblant des processus biologiques, avec des applications dans tous les domaines de la médecine (oncologie, neurologie, cardiologie, etc.). Les différents types d’imagerie nucléaire sont tous basés sur le principe de la scintigraphie et reposent par conséquent sur la détection de rayonnements gamma émis par un radionucléide. L’énergie du rayonnement doit en outre être comprise entre 80 et 500 keV afin d’être détectable par une gammacamera.

I.1.5.1 Principes de détection

I.1.5.1.1 Quatre modes d'émission gamma

Comme énoncé précédemment, l'utilisation d'un radionucléide émetteur gamma est un prérequis indispensable pour l'imagerie nucléaire. Cependant, le radionucléide n'est pas nécessairement un émetteur gamma pur. On distingue ainsi quatre types de désintégrations conduisant à l'émission de photons gamma :

- ⇒ Émission γ pur : ces radioéléments décroissent en un atome plus stable en libérant de l'énergie sous forme d'un photon gamma suivant la formule : ${}^A_Z X^* \rightarrow {}^A_Z X + \gamma$. Par exemple, le technétium-99m décroît en technétium-99 par émission d'un photon gamma de 140 keV.
- ⇒ Capture électronique (CE) : un électron d'une orbitale proche du noyau est capturé par un proton pour former un neutron. Le noyau ainsi formé se trouve dans un état excité et retourne à l'état fondamental par une émission gamma. On peut dans ce cas appliquer la formule : $e^- + {}^A_Z X \rightarrow {}^A_{Z-1} Y + \nu + \gamma$, où ν est un neutrino. L'indium-111 décroît en cadmium-111 par capture électronique. La capture électronique entraîne généralement l'émission de rayons X et/ou d'électrons Auger par réarrangement du cortège électronique.
- ⇒ Émission β^+ : il est possible de produire des radioisotopes possédant un défaut de neutron(s) par rapport au noyau stable correspondant. Dans ce cas, un proton d'un noyau instable se transforme en neutron et émet simultanément un positon β^+ selon l'équation : ${}^A_Z X \rightarrow {}^A_{Z-1} Y + \beta^+ + \nu$. Cette émission de particule β^+ peut s'accompagner d'une émission γ plus ou moins énergétique suivant le radionucléide considéré. Le positon, après avoir effectué un parcours de 0,5 à 5 mm dans les tissus biologiques, s'annihile en rencontrant un électron de la matière environnante. Cette annihilation conduit à l'émission de deux photons de 511 keV chacun dans des directions diamétralement opposées. Ainsi, le gallium-68 décroît en zinc-68 par une émission β^+ .
- ⇒ Émission β^- : dans certains cas, un neutron du noyau instable est converti en proton, provoquant l'émission d'un électron afin de retrouver un état stable. Cette réaction appelée désintégration β^- peut se résumer selon la formule : ${}^A_Z X \rightarrow {}^A_{Z-1} Y + e^- + \bar{\nu}$, où $\bar{\nu}$ est un antineutrino. Tout comme la désintégration β^+ , cette émission d'électron peut s'accompagner d'une émission γ pouvant être détectée en scintigraphie. Les émetteurs β^- doivent néanmoins être utilisés avec précaution, car leur énergie est entièrement dissipée dans les tissus biologiques et sont plus irradiant. Ils ne trouvent d'ailleurs une

application qu'en radiothérapie métabolique. L'émission γ pourra alors être utilisée à des fins de suivi de traitement. Le lutétium-177 est ainsi utilisé du fait de son émission β^- à 498 keV, et émet également des photons γ à 208 et 113 keV pour décroître en hafnium-177.

I.1.5.1.2 La gammacamera

La technique de la scintigraphie repose sur la détection du rayonnement γ émis par le radionucléide. Le photon γ une fois émis, s'il n'est pas absorbé par le tissu biologique, parvient au niveau d'un détecteur situé au dessus du patient. Le problème technique qui se pose de prime abord est de pouvoir détecter le photon γ . En effet, ce photon est très énergétique, et les techniques utilisées (photomultiplicateurs, photodiodes) pour les photons visibles ou UV ne sont pas applicables. Pour cela, on utilise un cristal scintillateur permettant de convertir un rayonnement ionisant en signal lumineux ou UV.

En scintigraphie, ces dispositifs sont majoritairement des monocristaux de NaI ou de CsI dopés au thallium. L'arrivée d'un photon γ sur le cristal entraîne un phénomène de fluorescence. Le cristal est excité et retourne à l'état fondamental en émettant des photons UV ou visible. En théorie, le nombre de photon émis est proportionnel à l'énergie du photon γ incident, mais des pertes énergétiques peuvent survenir dans la pratique. Le cristal est couplé à des photomultiplicateurs afin d'amplifier le signal, car la scintillation ne produit que quelques milliers de photons UV. La localisation de la scintillation se fait ensuite par une lecture électronique qui consiste à comparer les différents signaux parvenus aux différents photomultiplicateurs et à rechercher le "barycentre" lumineux. Finalement, en sommant les différents signaux on obtient l'énergie émise par la scintillation.

Un des défis majeurs de la scintigraphie est de pouvoir localiser la source de l'émission. En effet, le système cristal - photomultiplicateurs ne permet pas de discriminer la direction des photons, ce qui conduit à une incertitude sur la position de l'émetteur. La solution consiste à interposer entre le patient et le cristal un collimateur. Celui-ci consiste en une série de séparations (les septas) dont le rôle est de sélectionner uniquement les photons arrivant face au cristal. Cela permet de lever une ambiguïté sur le positionnement de la source d'émission.

Il existe une autre source d'incertitude dans le processus de localisation de l'émetteur. En effet, lorsque les photons γ sont émis à l'intérieur du corps, ils rencontrent des obstacles sur leur trajectoire. Notamment, ils peuvent interagir dans le corps par effet Compton, et cet effet pourrait avoir pour conséquence une mauvaise localisation du point d'émission. Pour pallier cet inconvénient, on a recours à des mesures d'énergie. En effet, les photons Compton ont une énergie plus faible que les photons incidents. La gammacamera mesure donc l'énergie reçue et "rejette le point" si elle est différente de celle attendue (par exemple 140 keV pour le technétium-99m). La

Figure I-3 représente les deux phénomènes précités : le principe de la collimation (gauche), et la diffusion non linéaire du rayonnement (droite).

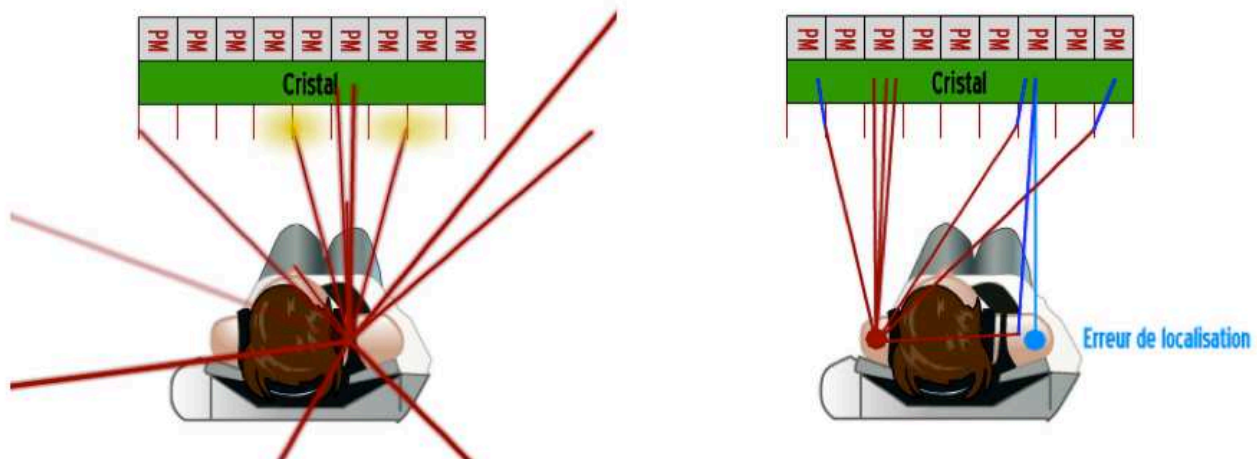


Figure I-3 : À gauche, les septas bloquent les rayonnements dont la direction n'est pas perpendiculaire au cristal. À droite, les trajets bleus représentent les trajectoires rejetées du fait d'une énergie trop faible.¹⁶

I.1.5.1.3 Sélection des radioisotopes

Le radioisotope ou marqueur est un atome radioactif possédant les mêmes propriétés physicochimiques que l'atome stable dont il est l'isotope. Ainsi, il possède la même biodistribution que son analogue "froid", et peut être détecté grâce au rayonnement qu'il émet. Ce marqueur radioactif est dans la plupart des cas intégré à un vecteur permettant de véhiculer le radionucléide vers une région d'intérêt. L'ensemble marqueur–vecteur est appelé radiotraceur ou radiopharmaceutique. Néanmoins, tous les radioisotopes ne peuvent être utilisés en scintigraphie. Ils sont principalement sélectionnés suivant leurs caractéristiques physiques et plusieurs paramètres sont alors à prendre en compte :

- *l'énergie des photons émis* : en scintigraphie, l'énergie des rayons gamma émis peut varier de 80 à 500 keV suivant le type d'appareil utilisé (80 à 300 keV pour la TEMP, 511 keV pour la TEP). Des photons de plus faible énergie seraient trop atténués par les tissus, alors qu'une énergie trop importante rendrait le traitement des données plus difficile et conduirait à des images de moindre qualité.

- *la période* : elle correspond à la durée au bout de laquelle l'activité spécifique du radioélément est diminuée de moitié. elle doit être adaptée à l'exploration pratiquée, soit suffisamment longue pour permettre une fixation maximale du radiotraceur (et donc obtenir des images de qualité optimale), tout en étant suffisamment brève pour limiter l'irradiation du patient.

- *mode de production, coût et disponibilité* : le facteur financier et la praticité prennent une importance majeure dans le choix des radiométaux. Les isotopes issus d'un cyclotron doivent être produits directement *sur site* à l'hôpital pour les radioisotopes à période très courte, ou, quand la durée de vie le permet, acheminés très rapidement à partir d'un centre régional. Une production par générateur est beaucoup plus avantageuse de par son prix de revient et sa facilité à être utilisé directement *sur site*.

I.1.5.2 La Tomographie par Émission MonoPhotonique (TEMP)

I.1.5.2.1 Principe

La TEMP (ou SPECT pour Single Photon Emission Computed Tomography) utilise une, deux ou trois têtes de détection en rotation autour du patient. Le fonctionnement de chacune de ces têtes est parfaitement identique à celui de celles utilisées en scintigraphie planaire. L'apport de la TEMP est l'acquisition en 3D. L'acquisition volumique est apportée par la rotation des caméras. L'image nécessite par la suite une reconstruction tomographique informatisée (Figure I-4).

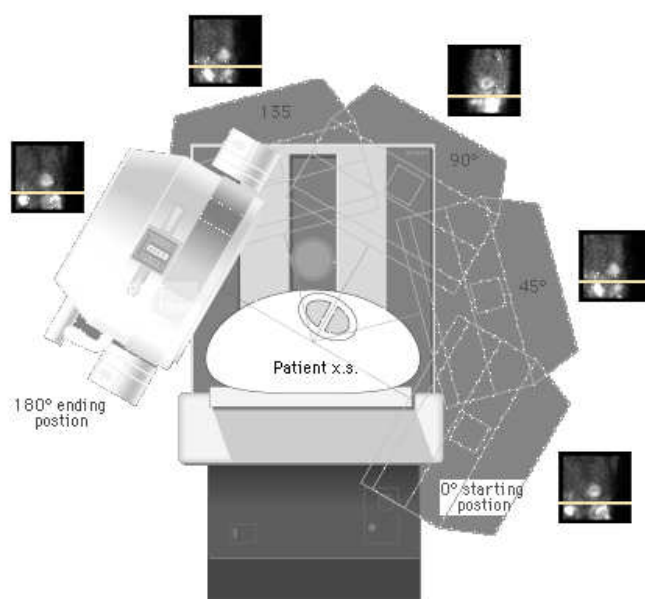


Figure I-4 : Principe de la caméra SPECT. Acquisition des projections à différents angles.¹⁷

La TEMP repose sur le principe de la tomographie par émission (par opposition à la tomodensitométrie où il s'agit de tomographie par transmission). La rotation permet d'acquérir plusieurs projections puis de reconstruire le volume. Plus le nombre d'angles est grand, meilleure sera la reconstruction. Afin de pouvoir localiser une source d'émission en 3D, il est nécessaire de prendre en compte le fait que le flux de photons reçu au niveau du détecteur dépend de la quantité de tissu traversée. De ce fait, il faut pouvoir corriger cette atténuation. En TEMP, une solution

consiste à placer une source \square externe au patient et à réaliser l'acquisition de cette source en rotation. L'informatique permet ensuite d'appliquer une correction à l'image. Si la TEMP souffre d'une faible résolution spatiale (8-12 mm en clinique) malgré de nets progrès dans le développement des caméras, elle reste une modalité incontournable du fait de sa grande sensibilité (10^{-11} - 10^{-12} M) et du grand choix de marqueurs disponibles.

I.1.5.2.2 Les radiopharmaceutiques en TEMP

Les radionucléides utilisés en TEMP ont des énergies d'émission \square situées entre 100 et 300 keV. En effet, la plupart des gammacaméras TEMP sont réglées pour avoir une détection optimale à 140 keV, la raie d'émission du technétium-99m. Le Tableau I-1 regroupe les radionucléides métalliques les plus utilisés en imagerie TEMP.

Radionucléides	$T_{1/2}$	Radiations			Méthode de production
		Type	Énergie	Abondance (%)	
^{67}Ga	78,2 h	\square	93 keV	35,7	cyclotron
			185 keV	19,7	
			300 keV	16,0	
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6 h	\square	140 keV	89,1	générateur
^{111}In	67,3 h	\square	171 keV	94,1	cyclotron
			245 keV	90,7	
^{177}Lu	159,5 h	β^-	498 keV	79,4	cyclotron
		\square	208 keV	10,4	
		\square	112 keV	6,2	
^{201}Tl	72,9 h	\square	167 keV	10,0	cyclotron
			135 keV	2,6	

Tableau I-1 : Principaux radionucléides métalliques utilisés en TEMP.

La majorité des radionucléides utilisés en TEMP sont des radioisotopes métalliques. Ainsi, la radiochimie pour l'imagerie TEMP s'est largement développée autour du technétium-99m du fait de son faible coût de production, de sa facilité d'obtention et de son émission \square pure à 140 keV. Le technétium-99m est produit à l'aide d'un générateur par décroissance du molybdène-99. Le générateur est une simple colonne d'alumine sur laquelle est adsorbé le molybdène-99. Le technétium-99m est récupéré par élution avec une solution saline, le molybdène-99 restant accroché à la colonne. Le technétium-99m se trouve dans un état métastable et présente donc l'avantage d'émettre exclusivement des photons \square sans que cette émission soit accompagnée de rayons X ou d'électrons Auger. La transition du technétium-99m en technétium-99 s'accompagne d'une

émission γ à une énergie de 140 keV qui offre un rendement de scintillation quasi optimal tout en évitant une irradiation trop importante du patient. Après élution, le radioélément est obtenu sous forme de pertechnétate de sodium (NaTcO_4) à l'état d'oxydation +VII.

Comme tout radionucléide, le technétium-99m doit être incorporé à une molécule biologiquement active avant l'administration au patient, le tout constituant un traceur radioactif. Ainsi, le technétium peut être injecté sous forme de complexe cationique pour l'étude de la perfusion myocardique (^{99m}Tc]MIBI et ^{99m}Tc]tetrofosmin).^{18,19} Un grand nombre de complexes technétiés sont utilisés en imagerie fonctionnelle cérébrale (^{99m}Tc]HMPAO, ^{99m}Tc]ECD, etc.),²⁰⁻²² et de nouveaux motifs peptidiques²³⁻²⁵ ou protéiques^{26,27} font l'objet de marquage au technétium *via* des précurseurs $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$. La Figure I-5 présente quelques exemples de complexes technétiés utilisés en TEMP. Cependant, malgré de nombreux avantages, le marquage au technétium peut souffrir de quelques inconvénients, notamment lors d'études à long terme, à cause de sa courte période. Il est également difficile de marquer une protéine sur une position spécifique, du fait de la stabilité relativement faible de ces radiochélates de technétium.

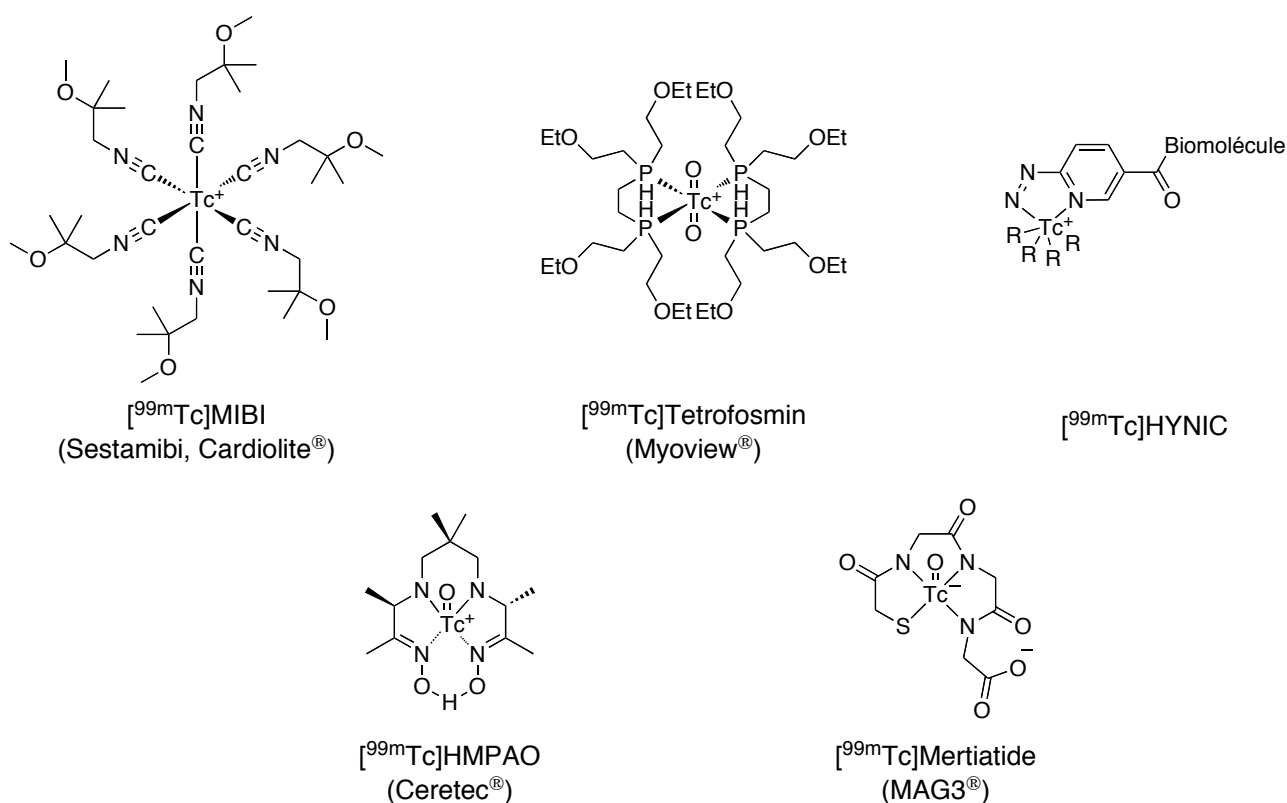


Figure I-5 : Exemples de complexes de ^{99m}Tc utilisés en TEMP.

L'indium-111 est un autre radionucléide couramment utilisé en TEMP. Sa double émission de photons γ (171 et 245 keV) par capture électronique et sa période de 2,8 jours en font un radioisotope particulièrement adapté pour l'étude de processus biologiques lents. L'indium est un cation métallique trivalent et nécessite donc, tout comme le technétium, une chélation appropriée. Il se coordine préférentiellement à des atomes donneurs durs, tels que l'azote ou l'oxygène. Ainsi,

l'oxinate d'indium est utilisé pour le marquage *in vitro* des éléments figurés du sang (globules blancs, globules rouges et plaquettes), administrés ensuite par voie intraveineuse pour différents examens scintigraphiques et pour des mesures d'échantillons sanguins. Les polyaminocarboxylates sont des agents chélatants ayant une très forte affinité vis-à-vis de l'indium-111, et on préfère donc utiliser des dérivés du DTPA (Acide diéthylènetriaminepentaacétique) ou du DOTA (1,4,7,10-Tétrazacyclododécane) pour le marquage de peptides ou de protéines. Par exemple, les analogues de la somatostatine de type Ocréotide ont été marqués à l'indium-111 pour la détection de tumeurs neuroendocrines via un motif DTPA ou DOTA.^{28,29}

L'indium, contrairement au technétium, est disponible sous forme "froide", c'est à dire non radioactif. Il est donc possible de synthétiser et d'étudier de nouveaux agents chélatants capables de se lier à l'indium pour former un complexe stable. Cet aspect sera discuté plus en détail dans le paragraphe I.3.

I.1.5.3 La Tomographie par Émission de Positron (TEP)

I.1.5.3.1 Principe

La TEP (ou PET en anglais pour Positron Emission Tomography) est sensible aux émetteurs de positons β^+ , dont l'annihilation avec un électron produit deux photons d'énergie égale à 511 keV. Tout comme la TEMP, la TEP permet une reconstruction en 3D du corps du patient, mais le principe de détection n'est pas exactement identique. Comme il a été énoncé précédemment, l'annihilation d'un positon β^+ avec un électron β^- génère une émission de deux photons dans des directions diamétralement opposées. La TEP tire profit de cette caractéristique, et les deux rayonnements sont dans ce cas détectés simultanément par une couronne de scintillateurs permettant de localiser précisément l'origine de l'émission. Ce principe de détection dit en coïncidence permet d'identifier la ligne sur laquelle se trouve la source d'émission des photons. Un système informatique permet ensuite de reconstituer à l'aide d'un algorithme de reconstruction les images de la répartition du traceur au niveau d'une partie ou de la totalité du corps sous la forme d'une image 2D ou d'un objet 3D (Figure I-6). La résolution spatiale de l'image ainsi obtenue est comprise entre 4 et 7 mm en clinique.

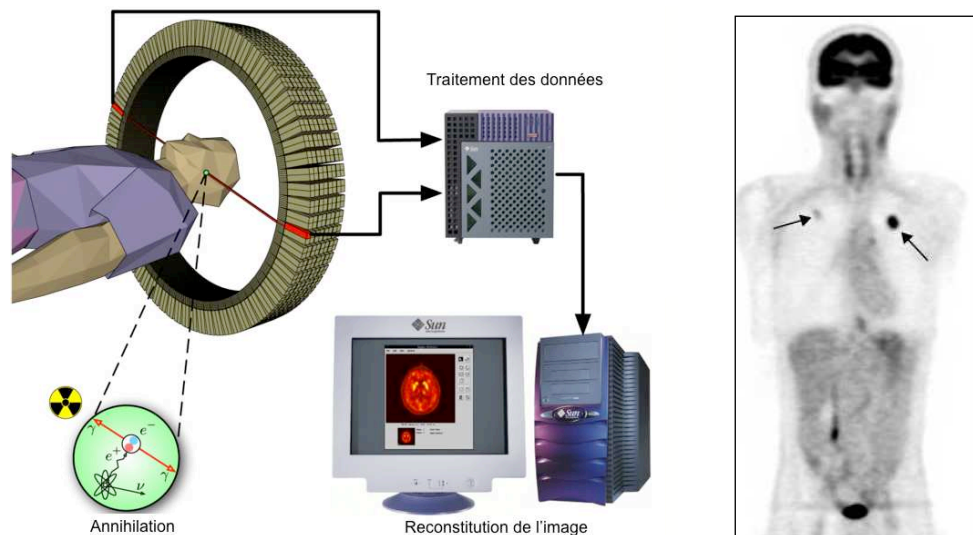


Figure I-6 : À gauche : illustration présentant le principe de fonctionnement d'un imageur PET. À droite, exemple d'une image "corps entier" obtenue par examen PET. L'injection du radiotracteur permet de confirmer la présence d'un nodule pulmonaire gauche, mais aussi la découverte d'un nouveau foyer au niveau du poumon droit (taches noires).³⁰

La TEP étant basée sur la détection des photons en coïncidence, certains phénomènes peuvent venir dégrader la qualité des images. La Figure I-7 résume les trois modes de coïncidence pouvant intervenir en TEP :

- La coïncidence vraie : elle constitue l'information utile. La ligne de réponse passe par la source d'émission, permettant ainsi une localisation de cette dernière.
- La coïncidence diffusée : un des photons de la paire est diffusé par le tissu biologique ou l'environnement. Le photon diffusé est détecté en même temps que le photon non diffusé. La ligne de réponse créée est donc erronée et conduit à une mauvaise localisation de la source d'émission. Cela conduit à un biais quantitatif et une augmentation du bruit de fond.
- La coïncidence fortuite : Les deux photons ne sont pas issus de la même source mais sont émis en même temps. Cela conduit à une mauvaise localisation (la ligne de réponse ne passe pas toujours par le patient) et un biais quantitatif. Il est aisé de comprendre que ce phénomène augmente avec l'activité injectée ou si on choisit une fenêtre temporelle de coïncidence trop longue.

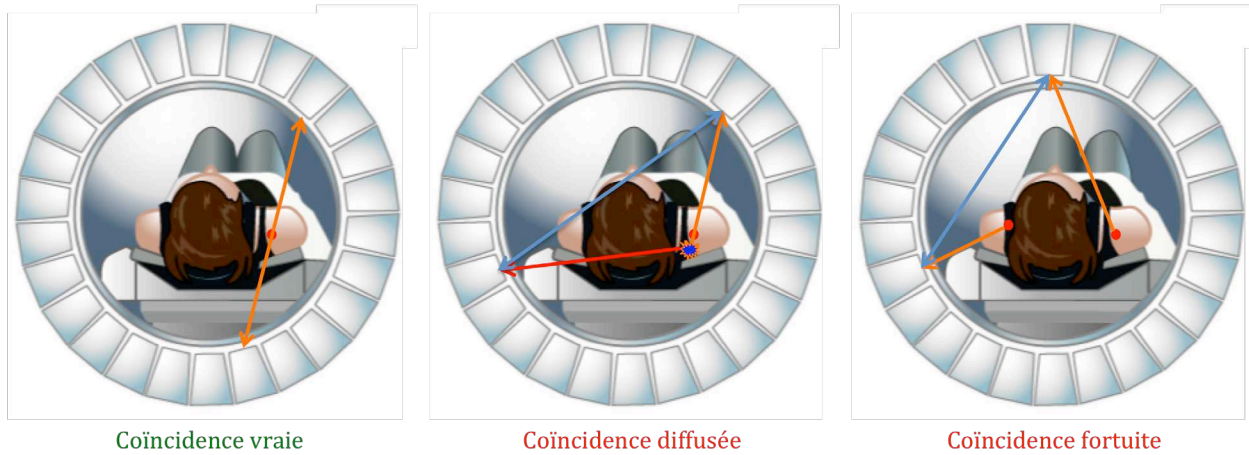


Figure I-7 : Schématisation des différents modes de coïncidence pouvant intervenir en TEP.³¹

I.1.5.3.2 Les radiopharmaceutiques en TEP

La nature des radionucléides utilisés en TEP est relativement variée. Ainsi, on utilisera suivant l'examen pratiqué des radioisotopes métalliques, organiques ou halogénés. Le Tableau I-1 regroupe les principaux radionucléides métalliques (hormis le fluor-18) utilisés en imagerie TEP.

Radionucléides	T _{1/2}	Radiations			Méthode de production
		Type	Énergie	Abondance (%)	
¹⁸ F	109,7 min	β ⁺	633 keV	96,7	cyclotron
⁵⁵ Co	17,5 h	β ⁺	1498 keV	46,0	cyclotron
			1021 keV	25,6	
		□	931 keV	75,0	
⁶⁴ Cu	12,7 h		477 keV	20,2	cyclotron
		β ⁻	579 keV	38,5	
		β ⁺	653 keV	17,6	
⁶⁸ Ga	67,7 min	□	1346 keV	0,5	générateur
		β ⁺	1899 keV	87,4	
		□	1077 keV	3,2	
⁸⁶ Y	14,7 h		1883 keV	0,1	cyclotron
		β ⁺	1220 keV	11,9	
		□	1077 keV	82,5	
⁸⁹ Zr	78,4 h		628 keV	32,6	cyclotron
		β ⁺	902 keV	22,7	
		□	909 keV	99,0	
⁹⁴ Tc	52 min		1713 keV	0,7	cyclotron
		β ⁺	810 keV	10,5	
		□	871 keV	99,9	
			703 keV	99,6	

Tableau I-2 : Exemples de radionucléides métalliques (sauf ¹⁸F) utilisés en TEP.

Parmi tous les radionucléides utilisés en TEP, le fluor-18 a pris une place prépondérante. Malgré une production par cyclotron, il reste un radioélément relativement bon marché du fait de son utilisation massive. En effet, dès le début des années 1970, T. Ido et A. Wolf ont décrit la synthèse du [¹⁸F]-fluorodéoxyglucose (¹⁸F-FDG) (Figure I-8).³² Cet analogue du glucose est désormais largement utilisé en clinique, et constitue la majorité des examens TEP réalisés dans le domaine de l'oncologie. Les examens TEP utilisant le FDG comme traceur s'appuient sur la surconsommation de glucose des cellules cancéreuses. En effet, pour vivre, fonctionner et se diviser, les cellules ont besoin d'énergie sous forme de glucose, sucre assimilable par l'organisme. Ainsi, plus l'activité des cellules est importante, plus leur consommation de glucose augmente. Les cellules cancéreuses possèdent un métabolisme très important du fait de leur taux de réplication important et captent donc beaucoup de ¹⁸F-FDG. C'est cette hyperfixation de ¹⁸F-FDG que l'on détecte par TEP. Cependant, la biodistribution du FDG manque de sélectivité. En effet, certains

organes comme le cerveau sont de grands consommateurs de glucose, et on observe donc une hyperfixation du FDG systématique au niveau de ces régions. Cela rend donc impossible la détection de certaines tumeurs à l'aide du FDG.

D'autres radiopharmaceutiques utilisant le fluor-18 sont utilisés en clinique : par exemple, le ^{18}F MISO est particulièrement utilisé pour l'évaluation de l'hypoxie tumorale, tandis que la ^{18}F FDOPA est indiquée pour la détection de tumeurs neuroendocrines, mais également de la maladie de Parkinson (Figure I-8).

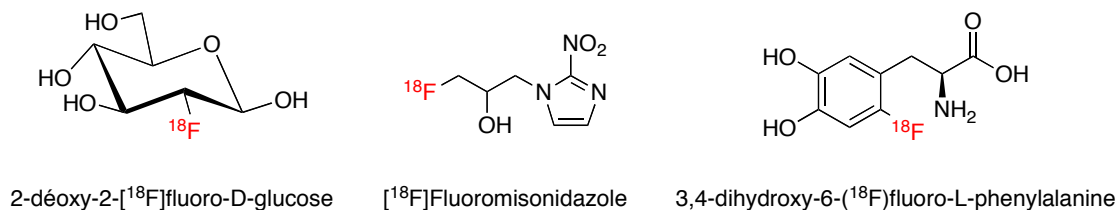


Figure I-8 : Formules chimiques du ^{18}F FDG, du ^{18}F MISO, et de la ^{18}F FDOPA.

Parmi les autres émetteurs de positons, le gallium-68 fait l'objet de nombreuses études. Tout comme l'indium, le gallium est un cation métallique trivalent qui peut également être complexé de façon stable par des agents chélatants de la famille des polyaminocarboxylates. L'intérêt du gallium-68 vient de son mode de production. En effet, contrairement au fluor-18 ou au cuivre-64 qui nécessitent un cyclotron, le gallium est produit à l'aide d'un générateur par décroissance du germanium-68. Ce radionucléide a notamment été utilisé pour le marquage de biomolécules *via* un agent chélatant adéquat, permettant d'obtenir des informations différentes d'une TEP au ^{18}F FDG.³³⁻³⁷

I.1.5.4 Innovations et avenir de l'imagerie nucléaire

Les techniques d'imagerie actuelles montrent des performances élevées, mais souffrent également de nombreuses limitations. Aujourd'hui, il est devenu possible de coupler certaines techniques d'imagerie, permettant ainsi de cumuler les avantages inhérents à chaque technique.

I.1.5.4.1 TEMP-TDM et TEP-TDM

Lorsque l'on compare l'imagerie nucléaire à d'autres techniques, le premier constat est le peu d'informations anatomiques d'un examen scintigraphique isolé. Pour pallier ce manque, les premiers appareils TEMP et TEP couplés à des scanners X sont apparus. Aujourd'hui, la majorité des examens TEMP ou TEP réalisés en oncologie sont effectués sur des appareils couplant la scintigraphie à la tomodensitométrie, appelés SPECT-CT ou PET-CT. Une reconstruction informatique des deux modalités permet une fusion des images, conduisant à une localisation

précise de la source de radioactivité (Figure I-9). La TDM permet en outre de corriger l'atténuation des photons par les tissus biologiques.

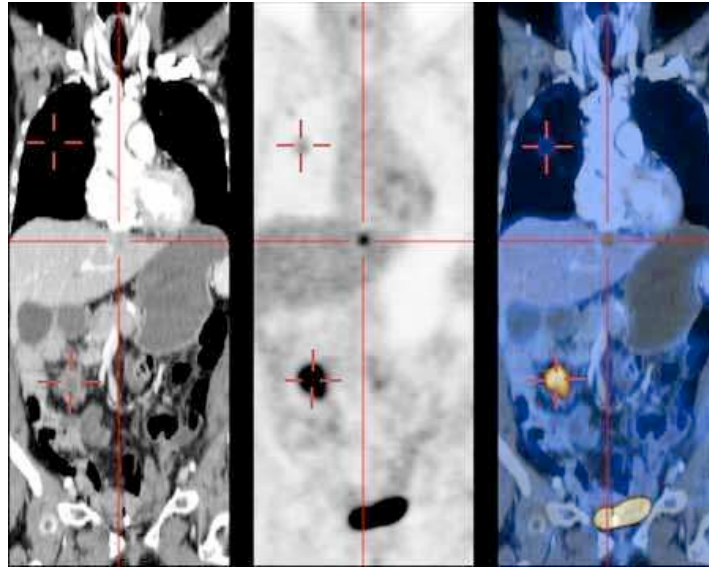


Figure I-9 : Coupe coronale du tronc mettant en évidence un cancer colorectal avec développement de métastases. À gauche, la vue en TDM donne les informations anatomiques ; au milieu, la vue en TEP indique clairement la présence de cellules cancéreuses ; la fusion des deux modalités est présentée à droite.³⁸

Ces systèmes conduisent néanmoins à une double irradiation, d'une part par la radioactivité, et d'autre part par les rayons X. Chaque examen doit donc être prescrit avec soin pour éviter toute irradiation excessive.

I.1.5.4.2 TEP-IRM

En complément de ces développements, d'autres appareillages font leur apparition, notamment des imageurs TEP-IRM (ou PET-MRI en anglais). L'IRM donnant l'information anatomique, ces instruments permettent donc d'éviter le cumul des rayonnements ionisants. De plus, l'IRM permet une meilleure visualisation des tissus mous, contrairement à la TDM (Figure I-10).

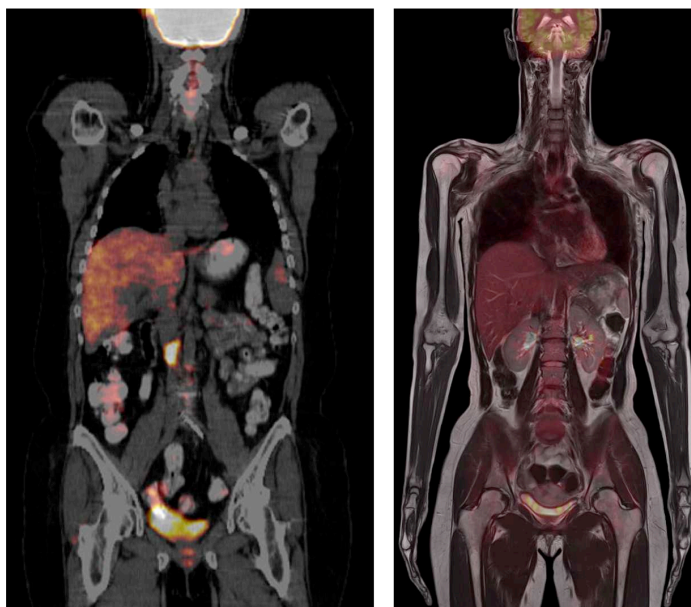


Figure I-10 : Comparaison d'une image PET-CT (gauche) et PET-IRM (droite).³⁹

I.1.5.4.3 SPECT/PET-Imagerie Optique

Contrairement aux exemples précédents, le couplage des techniques de scintigraphie avec l'imagerie optique n'apporte pas d'informations structurelles. L'imagerie optique vient ici confirmer le diagnostic réalisé par scintigraphie.⁴ Pour pouvoir être efficace, ces techniques nécessitent l'utilisation de plusieurs traceurs (fluorescent et radioactif). Des traceurs multimodaux portant à la fois un fluorophore adapté, et un marqueur radioactif peuvent également être utilisés. Ces systèmes peuvent alors être utilisés pour une double imagerie (préclinique),^{5,40} ou pour réaliser des actes chirurgicaux précis (Figure I-11).⁴¹⁻⁴³

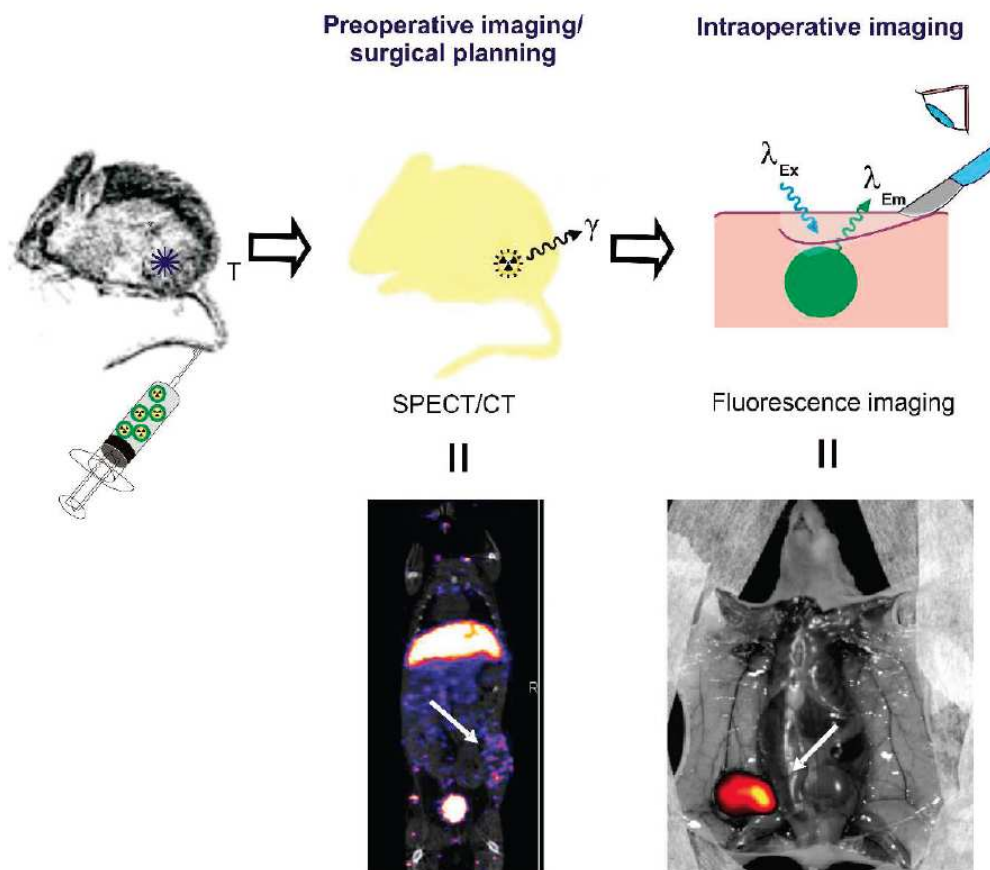


Figure I-11 : Exemple d'imagerie TEMP préopératoire suivie d'une imagerie optique intraopératoire. La tumeur est indiquée par une flèche. *Extrait de Kuil et al.*⁴²

En clinique, cette combinaison a par exemple été proposée et est en cours de développement pour la détection et la résection des ganglions sentinelles lymphatiques cancéreux.^{44,45} Ce premier exemple manque cependant de spécificité, et de nouveaux agents multimodaux font aujourd'hui l'objet de greffage sur des vecteurs biologiques spécifiques tels que des anticorps ou des peptides dans le but de cibler certaines tumeurs *in vitro* et *in vivo*.⁴⁶⁻⁴⁹

I.1.5.4.4 L'imagerie préclinique

Le développement de nouveaux radiopharmaceutiques passe avant tout par des études *in vitro* puis *in vivo*. Il est donc nécessaire de développer des appareils adaptés au petit animal afin de pouvoir envisager un développement clinique.

Comme il a été évoqué précédemment, la gamme de radiopharmaceutiques disponible en TEMP est très étendue et cette modalité demeure irremplaçable pour de nombreuses applications (ex : suivi prolongé) du fait de la courte période des radionucléides utilisés en TEP. Cependant, le mode de détection par coïncidence de la TEP conduit à une résolution plus élevée qu'en TEMP.

Si ces affirmations sont vraies pour l'imagerie clinique, les nouveaux appareillages dédiés au petit animal permettent d'obtenir des résolutions de l'ordre de 2 mm, et même 1 mm en TEMP-TDM. Il est donc possible d'évaluer avec une grande précision la biodistribution et l'efficacité d'un traceur quel que soit le type d'émetteur choisi. Les nouveaux appareils dédiés au petit animal sont donc aujourd'hui des outils indispensables à la validation de nouveaux traceurs avant de pouvoir envisager une transposition chez l'humain.

À travers cette introduction, nous venons de voir l'intérêt de chacune des techniques d'imagerie médicale pour l'étude et la compréhension de pathologies. Le développement actuel de l'imagerie moléculaire implique une recherche permanente autour des techniques permettant de réaliser un marquage spécifique, et les avantages de l'imagerie nucléaire en font un outil de choix pour la compréhension de processus biologiques à l'échelle moléculaire.

Si l'injection d'un radiopharmaceutique dans l'organisme nécessite de s'assurer de son devenir, il est important de bien comprendre le mode d'action du vecteur biologique utilisé. En effet, une connaissance approfondie des propriétés pharmacodynamiques de la biomolécule est un prérequis indispensable qui permet de guider le chimiste vers une méthode de marquage appropriée.

I.2 Un aperçu des vecteurs macromoléculaires en imagerie médicale

Le ciblage de pathologies ou de phénomènes biologiques précis nécessite l'utilisation de vecteurs biologiques appropriés. Si les éléments tels que le fluor-18 ou le carbone-11 sont utilisés pour le marquage de petites molécules telles que le FDG, les radiochélates sont plus couramment utilisés pour le radiomarquage de vecteurs de masse moléculaire plus élevée. Les anticorps monoclonaux et leurs dérivés font partie de ces vecteurs biologiques et sont largement utilisés du fait de leur grande affinité vis-à-vis d'une cible spécifique.

I.2.1 Généralités

I.2.1.1 Historique

En 1975, G. Köhler et C. Milstein découvrirent qu'il était possible de produire de façon efficace des anticorps reconnaissant le même épitope par la technique dite des hybridomes. Ces anticorps monoclonaux furent rapidement utilisés en immunothérapie, puis délaissés en raison d'importantes réponses immunitaires anti-anticorps de souris (réponse HAMA pour *human anti-mouse antibodies*) développées par les patients recevant des traitements à base d'anticorps monoclonaux de souris. Cependant, les avancées de l'ingénierie génétique ont par la suite permis

d'accéder à des anticorps monoclonaux chimériques souris-humain, puis complètement humanisés. Ces avancées technologiques majeures ont ainsi permis d'obtenir des résultats encourageants, tant pour des applications thérapeutiques,^{50,51} que pour l'utilisation des anticorps monoclonaux en immunoscintigraphie ou en radio-immunothérapie.^{52,53}

1.2.1.2 Structure des anticorps et nomenclature

Il existe cinq classes d'immunoglobulines humaines A, D, E, G et M, mais ce sont celles de classe G (IgG), d'un poids moléculaire d'environ 150 kDa, qui ont été les mieux étudiées. Les IgG constituent les anticorps "conventionnels" protecteurs circulant dans le sérum. Une IgG est constituée de deux chaînes lourdes identiques (H) d'environ 50 kDa et de deux chaînes légères identiques (L) d'environ 25 kDa. Chaque chaîne est organisée en domaines d'environ 110 acides aminés, deux pour les chaînes légères (VL et CL) et quatre pour les chaînes lourdes (VH, CH1, CH2 et CH3) (Figure I-12). Les domaines VL et VH appelés domaines variables sont ceux qui lient l'antigène. Chaque domaine variable possède trois boucles hypervariables appelées CDRs (*complementary determining region*) se caractérisant par une très grande variabilité en acides aminés d'un anticorps à l'autre. Ce site appelé paratope assure la fonction de reconnaissance d'une partie de l'antigène appelée épitope ; c'est le couple paratope/épitope qui assure la spécificité de l'anticorps pour un antigène. Les domaines CL, CH1, CH2 et CH3 sont quant à eux appelés domaines constants. Chaque domaine comporte un pont disulfure intracaténaire. La chaîne légère est reliée à la chaîne lourde par un pont disulfure localisé aux extrémités C-terminales des domaines CL et CH1 tandis que les chaînes lourdes sont reliées entre elles par des ponts disulfures localisés au niveau de leur région charnière (*hinge*) située entre les domaines CH1 et CH2.⁵⁴

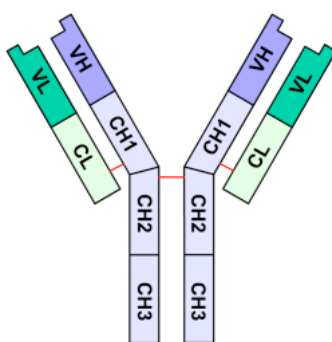


Figure I-12 : Représentation d'une immunoglobuline G.⁵⁵

Tous les anticorps monoclonaux utilisés en thérapeutique ont une dénomination commune internationale se terminant par le suffixe "mab" pour "monoclonal antibody". Au vu de l'augmentation croissante du nombre d'anticorps développés, il s'est avéré indispensable de créer une nomenclature plus spécifique permettant de reconnaître immédiatement l'origine ou la source de l'anticorps monoclonal. D'autres suffixes complémentaires ont donc été adoptés (Tableau I-3) :

“o-mab” pour les anticorps murins, “xi-mab” pour les chimériques, “zu-mab” pour les humanisés et “u-mab” pour les anticorps humains.

Type d'anticorps	Suffixe	% humanisation	Antigénicité	Quelques exemples
Murins	« momab »	0	+++	Muromomab (Orthoclone [®]) Ibritumomab (Zevalin [®])
Chimériques	« ximab »	60-70	+	Infliximab (Remicade [®]) Rituximab (Mabthera [®])
Humanisés	« zumab »	> 90	± 0	Trastuzumab (Herceptin [®]) Bévacizumab (Avastin [®])
Humains	« mumab »	100	± 0	Adalimumab (Humira [®])

Tableau I-3 : Nomenclature internationale simplifiée des différentes catégories d'anticorps monoclonaux. *Extrait de Scheen et al.*⁵⁶

Par la suite, la nomenclature s'est encore diversifiée puisqu'elle tient compte non seulement de l'origine de l'anticorps monoclonal, mais également de la cible thérapeutique potentielle de l'anticorps. Outre le suffixe indiquant la source de l'anticorps, la syllabe précédant ce dernier oriente également vers l'organe cible (Tableau I-4).

Préfixe	Cible	Type d'anticorps	Suffixe
Variable	-o(s)- Os	-u- Humain	-mab
	-vi(r)- Virus		
	-ba(c)- Bactérie		
	-li(m)- Immunitaire	-o- Souris	
	-le(s)- Infection		
	-ci(r)- Cardio-vasculaire	-a- Rat	
	-mu(l)- Musculo-squelettique		
	-ki(n)- Interleukine		
	-co(l)- Tumeur colique	-e- Hamster	
	-me(l)- Mélanome		
	-ma(r)- Tumeur mammaire	-i- Primate	
	-go(t)- Tumeur testiculaire		
	-go(v)- Tumeur ovarienne		
	-pr(o)- Tumeur prostatique	-xi- Chimérique	
	-tu(m)- Tumeur diverses		
-neu(r)- Système nerveux			
-tox(a)- Toxine comme cible	-zu- Humanisé		

Tableau I-4 : Nomenclature internationale détaillée des différents types d'anticorps monoclonaux, tenant également compte de la cible potentielle. *Extrait de Scheen et al.*⁵⁶

I.2.1.3 Fragments d'anticorps

On peut distinguer deux parties principales d'un anticorps : une partie appelée Fc (pour *fragment cristallisable*) possédant les fonctions dites effectrices, et deux parties Fab identiques (pour *fragment "antigen binding"*) comportant chacune un site de liaison à l'antigène. Il est possible d'isoler certaines régions de l'anticorps afin d'obtenir des fragments d'anticorps. Ainsi, on peut cliver une IgG par la papaine et obtenir deux fragments Fab de 25 kDa et un Fragment Fc de 50 kDa. On peut également cliver l'IgG à la pepsine qui coupe la molécule à la base des régions charnière et obtenir ainsi un fragment F(ab')₂, le fragment Fc étant dégradé. Il existe aujourd'hui de nombreux formats d'anticorps dépourvus de la région Fc qui sont capables de se lier à l'antigène.

En plus des Fab et des F(ab')₂, on peut citer les Fab', qui sont obtenus par réduction sélective des ponts disulfure intercaténaux situés au niveau des régions charnières. Ainsi, il est possible de cibler les fonctions thiol libres afin de greffer un marqueur de façon spécifique *via* une fonction maléimide.

Il est possible, à partir d'une IgG, de générer de nombreux types de fragments d'anticorps. Par exemple, le fragment scFv (*single chain variable fragment* : VH associé au domaine VL et reliés entre eux par une chaîne peptidique) a largement été utilisé. Ces fragments sont souvent étudiés sous la forme de fusion à des toxines ou des cytokines. Il est également possible, toujours à partir de ces scFv, d'obtenir d'autres formats appelés minibody, bi-scFv, diabody, triabody, tetrabody, dont certains peuvent, tout comme les F(ab')₂, conduire à des fragments d'anticorps multivalents et multispécifiques.⁵⁷ La Figure I-13 donne un aperçu des différents fragments d'anticorps, qu'ils soient obtenus par simple digestion bactérienne ou enzymatique, ou par biosynthèse.

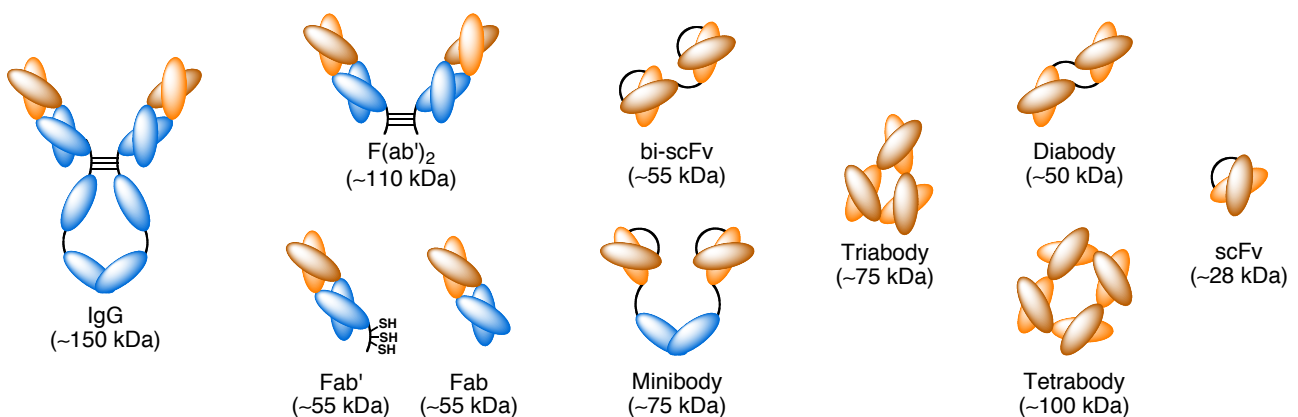


Figure I-13 : Les différents formats d'anticorps.

Enfin, il est possible de produire par synthèse peptidique des molécules mimant la composition et la conformation des parties de l'anticorps se liant à l'antigène (paratope) et que l'on appelle affibody.

1.2.2 Les anticorps en médecine nucléaire

Dès le début des années 1970, plusieurs laboratoires ont utilisé des anticorps radiomarqués dans le but de localiser par imagerie des marqueurs tumoraux dans des modèles animaux. Avec l'avènement des anticorps monoclonaux et le développement des gammacaméras, ces recherches ont été étendues au diagnostic de tumeurs malignes chez l'homme.⁵⁸ Si les IgG sont largement utilisées en milieu clinique pour la thérapie, ils restent néanmoins peu développés en immunoscintigraphie. En effet, les coûts de développement d'anticorps pour l'imagerie étant proches de ceux des anticorps thérapeutiques, il est probable que les firmes pharmaceutiques préfèrent investir sur des produits thérapeutiques dont le marché est nettement supérieur. Les anticorps monoclonaux connaissent cependant un regain d'intérêt à travers le développement de nouveaux fragments synthétisés par ingénierie des protéines. La section suivante sera dédiée à la description des anticorps et dérivés d'anticorps utilisés en immunoscintigraphie tout en présentant les avantages et les inconvénients liés à l'utilisation de chaque dérivé.

Les IgG, en tant que protéines "mères", ont bien entendu une affinité pour leur antigène bien supérieure à tous les fragments qui en sont issus. Pour cette raison, elles sont des vecteurs de choix pour la détection de cellules cancéreuses. Elles présentent l'avantage d'avoir un long temps de vie dans l'organisme, permettant ainsi une accumulation du radiotracer au niveau des cellules cancéreuses. Leur poids moléculaire élevé évite également une élimination rénale de la protéine, généralement beaucoup plus rapide qu'une élimination hépatique. Le greffage d'un radiomarqueur s'effectue généralement au niveau de la région Fc, puisque ce dernier ne joue aucun rôle dans la reconnaissance de l'antigène.

En revanche, si le poids moléculaire élevé des IgG semble un atout pour une accumulation optimale du traceur, cela nécessite l'utilisation d'un radionucléide présentant une période longue, puisque l'accumulation de l'anticorps à la surface des cellules cancéreuses reste relativement lente. Cette caractéristique est d'autant plus marquée dans le cas de tumeurs solides, dont seules les cellules en périphérie de la masse tumorale sont accessibles de prime abord. Les IgG étant des protéines circulantes, elles bénéficient/souffrent d'un long temps de résidence dans la circulation sanguine, induisant par la même une augmentation du bruit de fond. L'accumulation de ces inconvénients, et ce malgré les nombreux avantages des IgG, a conduit à une diminution de l'utilisation des anticorps monoclonaux en imagerie médicale. Ainsi, en 2010, on ne comptait plus que trois radiotraceurs cliniques comportant un anticorps entier.

Dans un premier temps, afin de pallier ces problèmes, des fragments d'IgG ont été générés par digestion protéolytique. On a ainsi pu obtenir des fragments F(ab')₂ par digestion à la pepsine, mais ces fragments de 110 kDa restent trop volumineux pour être éliminés par voie rénale, dont le seuil de coupure se situe aux alentours de 60 kDa. Cependant, une réduction partielle des ponts disulfure

à l'aide d'un agent réducteur doux tel que la 2-mercaptoéthylamine permet d'obtenir un fragment Fab',⁵⁹ avec un poids moléculaire d'environ 55 kDa.

La digestion d'une IgG par la papaïne conduit à la formation d'un Fab d'environ 55 kDa. Ces deux types de fragments caractérisés par une élimination rénale plus rapide que les IgG ont trouvé des applications en immunoscintigraphie⁶⁰⁻⁶² et constituent la majorité des immunoconjugés utilisés en scintigraphie.⁶³ Cependant, ces radiotraceurs ne possèdent qu'un seul site de liaison et ont donc une moins bonne affinité vis-à-vis de leur cible. Ces premiers pas ont néanmoins permis de mettre en évidence le fait que la clairance de la protéine (c'est à dire sa voie et sa vitesse d'élimination) est fonction de son poids moléculaire (Figure I-14).

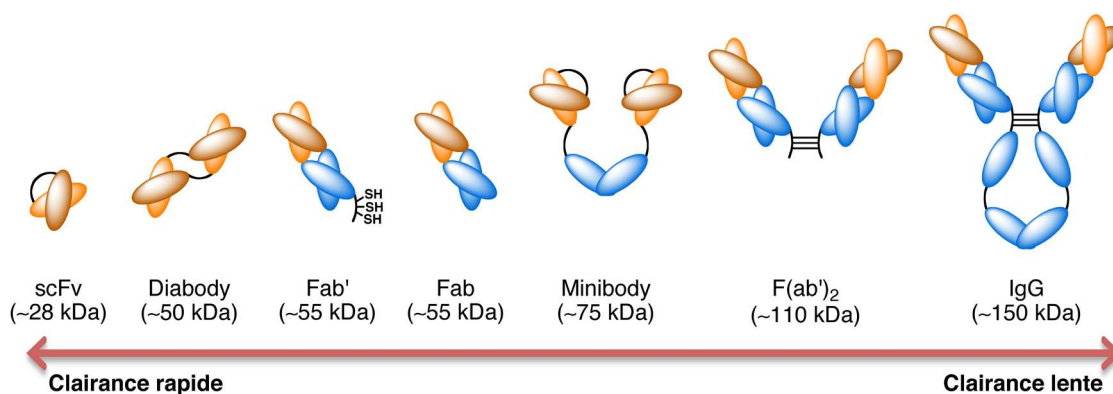


Figure I-14 : Clairance des anticorps et fragments d'anticorps en fonction de leur poids moléculaire.

Aux vues de ces lacunes, les recherches se sont focalisées sur la production de fragments d'anticorps par génie génétique, avec l'apparition des scFv. Ces petits fragments d'environ 28 kDa ont montré de bonnes affinités *in vivo* pour leurs cibles.⁶⁴⁻⁶⁶ Les scFvb ont été majoritairement marqués au technétium-99m, les tentatives de radioméallation au lutétium-177 ou à l'indium-111 se soldant généralement par une forte accumulation rénale et une faible détection des foyers cancéreux.^{67,68} Cependant, la petite taille de ces molécules leur confère un temps de demi-vie trop faible (h). Si l'on ajoute à ceci une faible affinité fonctionnelle due à l'unique site de liaison disponible, il en résulte des temps de rétention tumoraux très modestes, et conséquemment une qualité d'image médiocre.⁵⁷

L'augmentation de la taille des fragments par la formation de dimères (diabodies), de trimères (triabodies), ou de tétramères (tétrabodies) est alors apparue comme une alternative intéressante. Ces dérivés ont effectivement montré des temps de demi-vie plus élevés permettant d'atteindre des accumulations de radioactivité importantes au niveau des tumeurs.⁶⁹⁻⁷¹ Malgré tout, on note toujours pour ce type de fragment une importante accumulation au niveau des reins, probablement due à la dissociation des multimères en monomères.⁷²

Afin de remédier à cette accumulation rénale excessive, de plus gros fragments excédant le seuil de clairance rénale (<60 kDa) ont été développés. La synthèse de ces minibodies (75 kDa) découle d'une fusion entre deux scFv et deux domaines CH3 d'un Fc. Ces systèmes forment un "mini-anticorps" ayant des propriétés intermédiaires entre scFv et IgG. Si certains minibodies ont montré les propriétés attendues, c'est-à-dire une forte et rapide accumulation de l'anticorps dans la

tumeur accompagnée d'une clairance hépatique (Figure I-15),⁷³⁻⁷⁵ de nombreux cas ont fait état de très faibles marquages tumoraux.⁷⁶⁻⁷⁸

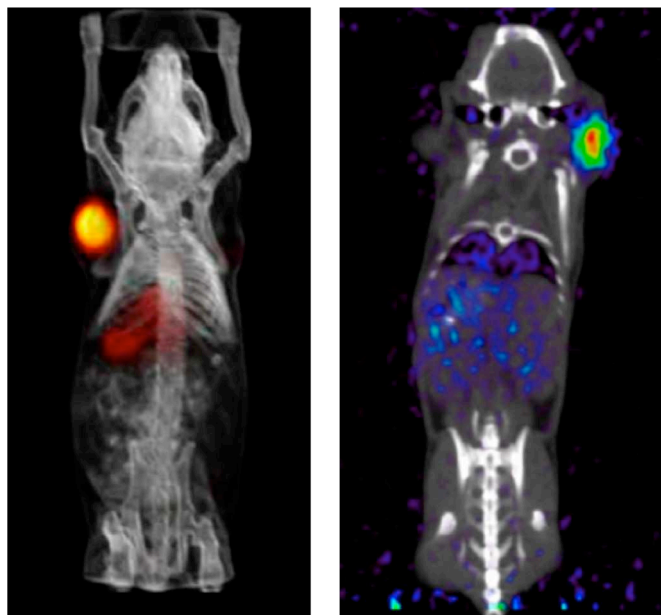


Figure I-15 : Les minibodies marqués au ^{124}I ont permis la visualisation de cellules tumorales surexprimant certains antigènes tels que les CEA (carcinoembryonic antigen) (gauche) ou les CD20 (B-lymphocytes antigen CD20) (droite) 20 h après injection. Les minibodies (75 kDa) non liés sont éliminés par voie hépatique. *Extrait de Wu et al.*⁷⁵

Ces phénomènes pourraient provenir d'une internalisation suivie d'un métabolisme rapide des minibodies au sein des cellules, induisant une forte augmentation de la radioactivité au niveau du foie, mais également des reins.

D'autres fragments d'anticorps ont également été développés,^{79,80} toujours accompagnés de leurs lots d'avantages et d'inconvénients. La recherche de traceurs toujours plus performants conduit au développement de toujours plus de vecteurs biologiques, dérivés d'IgG ou non.^{81,82} Il est donc clair que la fabrication d'anticorps pour la détection de tumeurs n'est pas une tâche aisée, et que chaque type d'anticorps ou de fragment possède des avantages et des limitations. Le choix du vecteur doit donc se faire en fonction du type de tumeur en prenant en compte la lignée cellulaire étudiée, puisque chaque type de cellule a un comportement différent vis-à-vis du ligand. Mais au-delà de cette adéquation anticorps — antigène, ce choix devra également tenir compte des moyens mis à disposition pour le radiomarquage, qu'il s'agisse du type d'imager ou du radionucléide utilisé.

I.3 Les agents bifonctionnels chélatants en médecine nucléaire

Nous l'avons évoqué précédemment, la majorité des examens en TEP utilisent le [^{18}F]-FDG ou de petites molécules marquées au fluor-18 en tant que radiotraceurs. Du fait de la courte période du fluor-18 (110 min), ces molécules doivent être synthétisées dans des délais très courts, et on a dans ce cas recours à des méthodes de marquage dites "directes". Cette méthode de radiomarquage a également été appliquée en TEMP pour le marquage d'anticorps monoclonaux ou de peptides au $^{99\text{m}}\text{Tc}$, impliquant alors les groupements chélatants libres des chaînes latérales des acides aminés présents au sein de la protéine.⁸³ Cependant, il est difficile de définir avec précision la nature des sites impliqués et donc de prédire la stabilité du complexe formé.

Une alternative consiste à lier de façon covalente un agent chélatant à la protéine, puis à réaliser un marquage "indirect" avec un radionucléide métallique. Le métal est alors encapsulé par l'agent chélatant afin d'éviter son relargage dans l'organisme (Figure I-16).

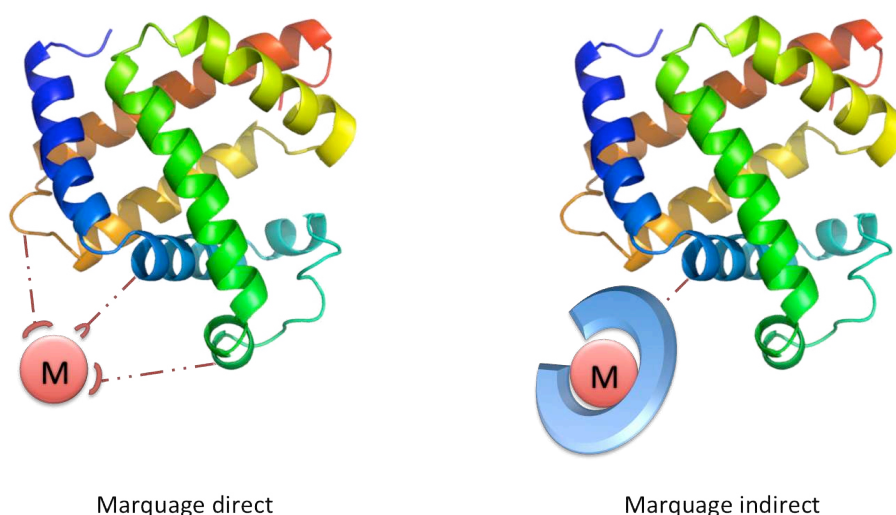


Figure I-16 : Illustration d'un radiomarquage métallique par voie "directe" et voie "indirecte".⁸⁴

Cette voie, plus élégante que le marquage indirect, nécessite cependant une connaissance approfondie de la chimie de coordination des métaux afin de prédire le plus précisément possible le devenir du radiochélate *in vivo*. Le développement d'un agent bifonctionnel chélatant peut alors se caractériser par deux étapes clés :

- D'une part, il est nécessaire de choisir une fonction de greffage adaptée au vecteur biologique utilisé, afin de former une liaison stable entre la biomolécule et l'agent chélatant.
- D'autre part, l'autre phase majeure dans le développement de nouveaux radiotraceurs consiste à choisir et développer un agent chélatant performant permettant de contrôler au mieux la stabilité cinétique et thermodynamique du complexe afin de limiter sa toxicité *in vivo*.

La section suivante sera donc consacrée à la présentation et la sélection de fonctions réactives biocompatibles pouvant être intégrées à des systèmes chélatants. Par la suite, nous présenterons les différentes molécules adaptées à la complexation de l'indium, et par extension, des métaux de transition et de post-transition trivalents cités précédemment. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux agents chélatants polyazamacrocycliques, dont les très bonnes capacités chélatantes en font en outre d'excellents ligands pour le gadolinium (IRM) et certains lanthanides (imagerie optique).

I.3.1 Les fonctions de greffage pour la bioconjugaison

Afin de pouvoir être vectorisé par une molécule biologique, il est nécessaire de modifier chimiquement l'agent chélatant sélectionné pour le lier de façon covalente à la biomolécule. Cette section est donc consacrée à la description des principales fonctions de greffage disponibles, notamment celles destinées au marquage de vecteurs biologiques macromoléculaires ne pouvant être obtenus par synthèse peptidique. Ces fonctions réactives doivent avoir une grande sélectivité pour une fonction spécifique, et la réaction de couplage doit être effectuée en un minimum de temps, dans des conditions douces et en milieu aqueux dans l'immense majorité des cas.

Les principales cibles des fonctions de greffage sont donc les fonctions réactives des acides aminés naturels disponibles. On ciblera donc majoritairement les amines primaires en N-terminal de la chaîne polypeptidique et des résidus lysine. La fonction thiol de la cystéine ou le groupement phénol de la tyrosine sont également des cibles possédant un fort potentiel de bioconjugaison (Figure I-17).⁵⁹ Les fonctions acide carboxylique présentes en C-terminal et sur les chaînes latérales de l'acide aspartique et de l'acide glutamique constituent des cibles réactives intéressantes. Cependant, les réactions de bioconjugaison sur ces résidus restent compliquées du fait de la nécessité d'activer la fonction carboxylate avant de pouvoir initier une réaction de couplage. On assiste donc souvent à des réactions de couplages croisés entre deux protéines, favorisant la formation d'agrégats.

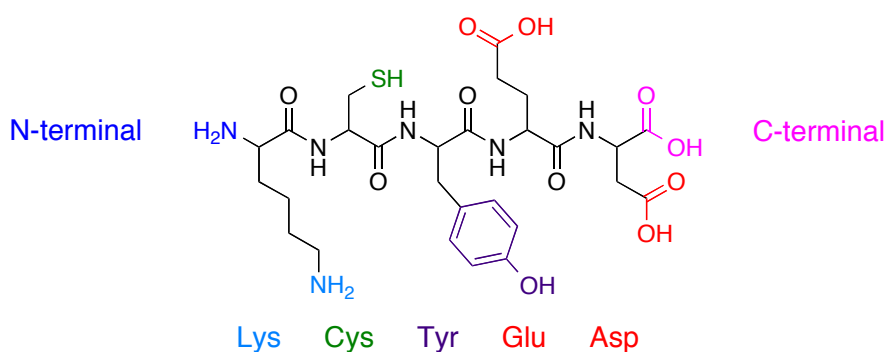


Figure I-17 : Principaux amino acides ciblés pour la bioconjugaison.

I.3.1.1 Ciblage des amines

Les amines primaires constituent les cibles disponibles pour la bioconjugaison les plus nombreuses et les plus souvent visées. En effet la lysine fait partie des acides aminés naturels les plus représentés, et les amines primaires sont des fonctions qui présentent des réactivités variées avec nombre de fonctions de greffage.

La manière la plus simple de former une liaison stable entre un agent chélatant et une amine primaire consiste à réaliser un couplage peptidique à l'aide d'agents de couplage. On tire alors profit de la présence de fonctions acide carboxylique sur le macrocycle pour former un ester activé instable, mais très réactif vis-à-vis des amines primaires afin de former la liaison amide correspondante.^{85,86} Cette méthode simple reste cependant limitée puisque la formation de l'espèce activée n'est pas contrôlée, ce qui peut engendrer la modification de plusieurs carboxylates sur la même molécule. Une seule molécule sera donc susceptible de réagir simultanément avec plusieurs résidus lysines, ce qui peut conduire à la formation d'agrégats de protéines.

De nouvelles méthodes de synthèse ont permis d'isoler l'agent chélatant porteur d'une seule fonction ester activé. Aujourd'hui, les esters activés les plus utilisés sont les esters *N*-succinimidyl (NHS), *N*-sulfosuccinimidyl (Sulfo-NHS), et pentafluorophényle (Figure I-18).⁸⁷⁻⁹⁰ Notons que l'hydrolyse de l'ester activé est rapide et entre donc en compétition avec la formation de la fonction amide.

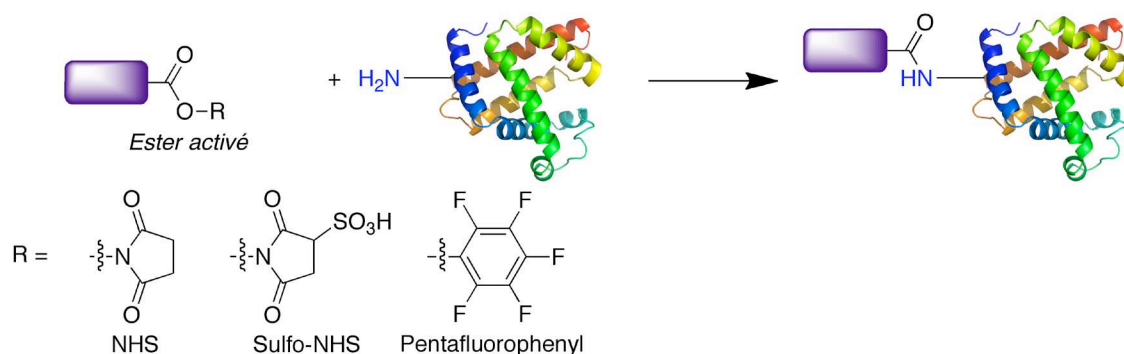


Figure I-18 : Formation d'une liaison amide par réaction d'un ester activé avec une amine primaire.

Les anhydrides cycliques constituent également des fonctions de greffage de choix pour la formation de liaisons amides (Figure I-19).⁹¹⁻⁹⁵ En effet, leur grande réactivité vis-à-vis des amines permet de réaliser la bioconjugaison en des temps très courts (□ h). La synthèse de ces dérivés reste cependant délicate et ne peut être adaptée à toutes les molécules. De plus, si ces composés ont une réactivité sans égal, leur hydrolyse est également très rapide. Les réactions de couplage doivent donc être optimisées afin d'éviter au maximum l'hydrolyse du composé.⁹⁶

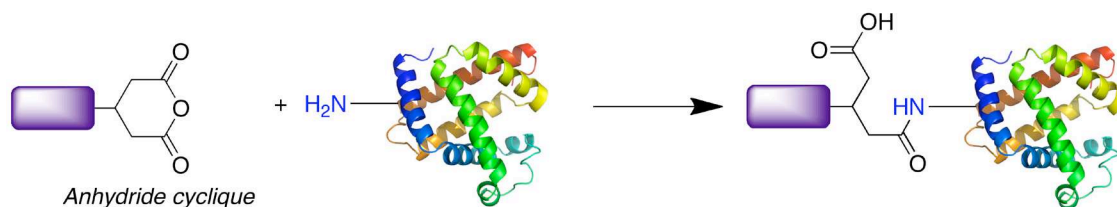


Figure I-19 : Ouverture d'une fonction anhydride cyclique par une amine primaire.

Enfin, les fonctions de greffage de type isothiocyanate sont également très régulièrement utilisées pour la bioconjugaison (Figure I-20).⁹⁷⁻⁹⁹ Ce groupement présente l'avantage d'être largement moins sensible à l'hydrolyse que les fonctions de greffage précédemment citées. Cette particularité en a fait un groupement réactif très utilisé, notamment pour la préparation de nombreux agents chélatants.¹⁰⁰⁻¹⁰² Si la fonction isothiocyanate est robuste vis-à-vis de l'hydrolyse, leur greffage est néanmoins plus difficile et nécessite souvent un léger chauffage (37 °C) afin de favoriser la formation de la liaison thiourée.

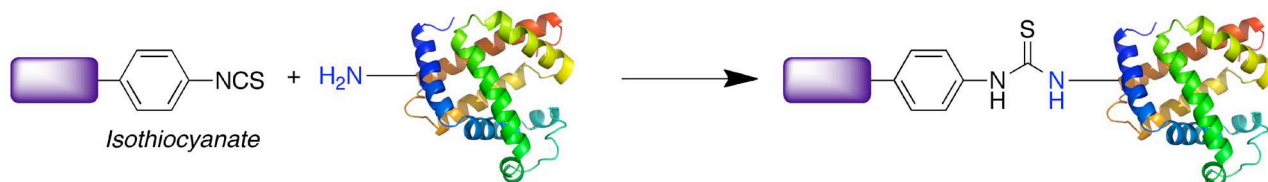


Figure I-20 : La réaction entre une fonction isothiocyanate et une amine primaire conduit à la formation d'une liaison thiourée.

I.3.1.2 Ciblage des fonctions thiol

Les fonctions thiol constituent une cible de choix lors des réactions de bioconjugaison. On distingue majoritairement deux types de réactions permettant de lier un marqueur à une biomolécule *via* une fonction thiol. Dans le premier cas, il s'agit d'une réaction croisée d'échange de pont disulfure : la fonction de greffage est constituée d'une fonction thiol formant un pont disulfure avec un fragment pyridyl. Cette fonction réagit en présence d'une fonction thiol libre par le départ d'une molécule de pyridine-2-thione et la formation d'un pont disulfure entre la biomolécule et le marqueur.¹⁰³⁻¹⁰⁵ Cette réaction concertée peut également être réalisée avec d'autres dérivés disulfures.¹⁰⁶ Cette liaison disulfure n'est cependant pas stable en milieu réducteur, et pourra donc donner lieu *in vivo* à la dissociation de la molécule greffée.

L'utilisation d'une fonction maléimide permet également de lier un ligand à une protéine de façon covalente par la formation d'une fonction thioéther.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ On notera que la fonction maléimide peut réagir avec les amines primaires si la réaction de couplage n'est pas réalisée à un pH optimal (pH 6,5-7,5).⁵⁹

La Figure I-21 présente les différentes réactions de bioconjugaison ciblant une fonction thiol décrites ci-dessus.

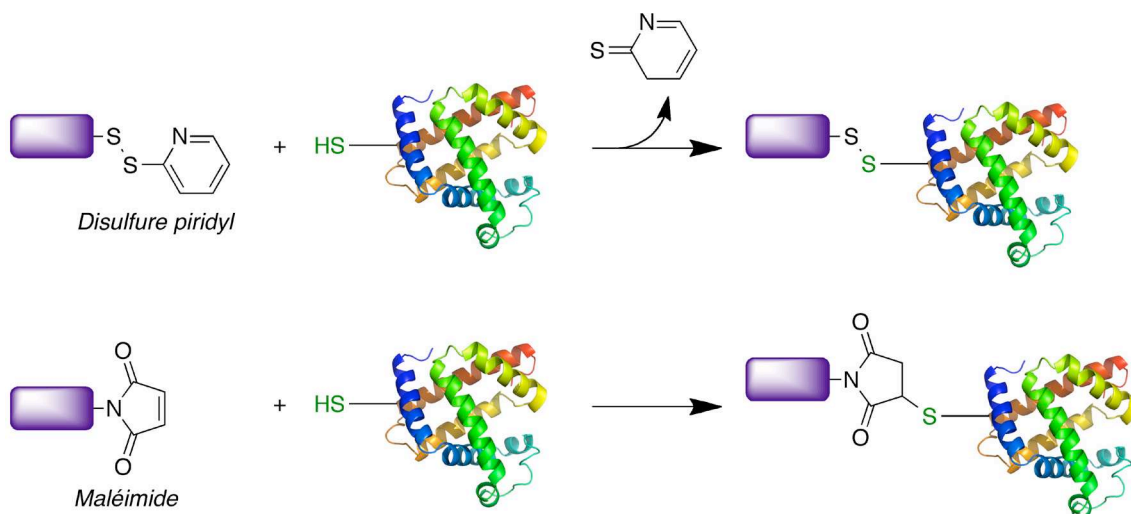


Figure I-21 : Principales réactions de bioconjugaison ciblant les fonctions thiols.

La cystéine, seul acide aminé porteur d'une fonction thiol, n'est que peu représentée dans une protéine et dans la majorité des cas, les thiols ne sont présents que sous forme de ponts disulfures. Il est cependant possible d'introduire des fonctions thiol surnuméraires par réaction du 2-iminothiolane (réactif de Traut) avec les fonctions amine primaire (Figure I-22). Il est également possible de réduire sélectivement certains ponts disulfures d'une biomolécule afin de libérer des fonctions thiols, sans compromettre l'activité biologique de la protéine.

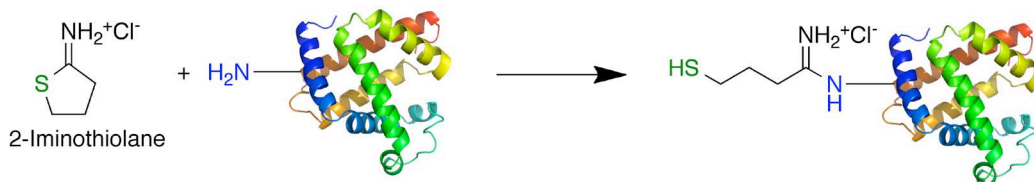


Figure I-22 : Insertion d'un thiol par réaction d'une amine primaire avec le réactif de Traut.

Il est à noter que l'insertion d'une cystéine surnuméraire est également réalisable lors de la production d'une protéine recombinante par génie biologique.

1.3.1.3 Ciblage des tyrosines

Le couplage entre un marqueur et une protéine *via* les groupements phénol des tyrosines constitue une alternative intéressante si le couplage sur les amines ou les thiols n'est pas envisageable. Généralement, les tyrosines ne sont pas présentes en grande quantité, et sont localisées le plus souvent au niveau du site actif de la protéine. Néanmoins, la faible proportion de tyrosine permet un greffage plus ciblé et donc un meilleur contrôle de la réaction de bioconjugaison.

Il est possible de greffer un marqueur sur une tyrosine par couplage diazoïque,¹¹⁰⁻¹¹² ou encore par une réaction de Mannich à trois composantes.^{113,114} Cependant de tels couplages restent difficiles à mettre en œuvre, et les résultats sont souvent aléatoires. Il a en outre été rapporté que ces réactions forment des couplages secondaires avec d'autres amino acides aromatiques, notamment le tryptophane.¹¹⁵ Récemment, Barbas et coll. ont décrit la synthèse d'une fonction de greffage de type diazodicarboxamide cyclique exclusivement sélective de la tyrosine,¹¹⁶ apportant ainsi une réelle alternative au greffage sur les résidus lysines (Figure I-23).

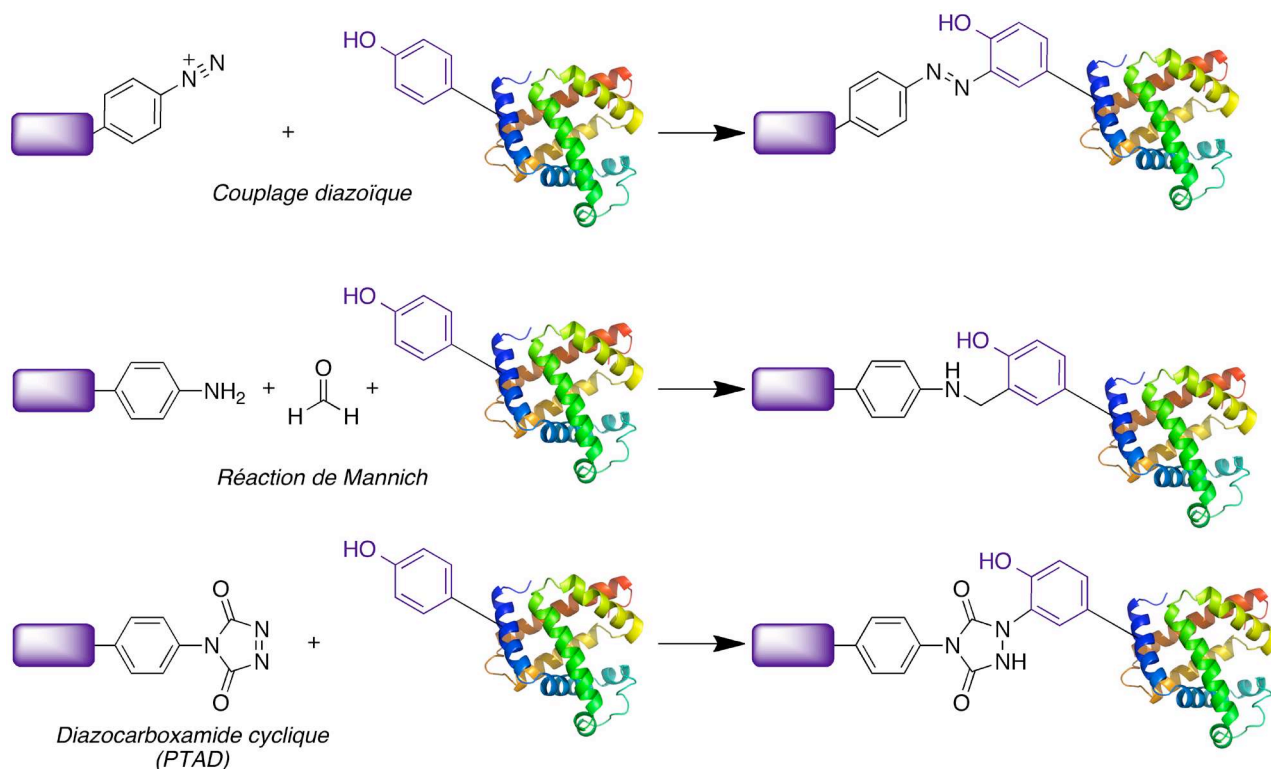


Figure I-23 : Principales réactions de bioconjugaison ciblant les tyrosines.

1.3.1.4 Ciblage d'acides aminés non naturels

Les paragraphes précédents ont donné un aperçu des différentes techniques de bioconjugaison covalentes à une protéine. Il existe bien évidemment d'autres techniques, plus ou moins efficaces et largement moins utilisées que celles présentées précédemment.^{59,117}

De la même façon que pour l'introduction d'une fonction thiol surnuméraire, il est possible d'introduire des cibles non usuelles par un "pré-greffage" sur l'un des acides aminés précités. Ainsi, on peut introduire une fonction azoture en vue d'un couplage avec un alcyne par une réaction de "click chemistry".¹¹⁸⁻¹²³ De la même façon, le greffage d'un groupement norbornène sur une

protéine permet une liaison spécifique à un marqueur fonctionnalisé par une tétrazine (Figure I-24).¹²⁴⁻¹²⁶

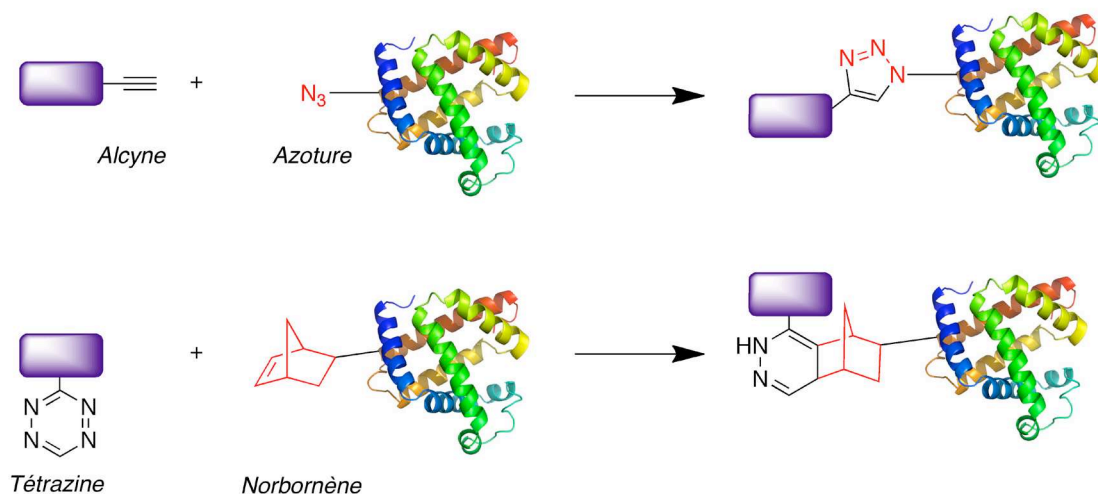


Figure I-24 : Exemples de réactions de bioconjugaison par des groupements non-naturels. Il est à noter que les fonctions réactives peuvent se situer indifféremment au niveau de la biomolécule ou de l'agent chélatant.

Enfin, notons qu'il est également possible d'introduire par ingénierie moléculaire des acides aminés non naturels porteurs de fonctions réactives. La synthèse peptidique en phase solide est alors un outil de choix pour ces applications.

I.3.2 Choix de l'agent chélatant : l'intérêt des polyazamacrocycles

Les agents chélatants occupent une place particulière en médecine nucléaire. Comme il a été mentionné, ils sont généralement utilisés sous forme d'immunoconjugués pour la chélation de radionucléide métallique présentant généralement une longue période (en comparaison au fluor-18 ou au technétium-99m). Outre le technétium-99m, on peut citer parmi les radionucléides les plus utilisés en médecine nucléaire l'indium-111, l'yttrium-90, le gallium-67 ou le lutétium-177. Ces dernières années, d'autres radionucléides tels que le gallium-68, le cuivre-64, le cuivre-67 ou encore le zirconium-89 ont fait leur apparition, venant étoffer un peu plus la panoplie du radiochimiste. Il est à noter que les sels métalliques de tous ces radionucléides sont disponibles sous leur forme "froide", ce qui permet la réalisation d'études physico-chimiques préliminaires. Les agents chélatants préconisés pour la complexation de ces métaux (ormis le zirconium) font tous partie de la famille des polyaminocarboxylate. Cette section sera donc dédiée à la description des principaux paramètres à considérer lors du développement d'un radiochélate de type polyaminocarboxylates. Ce travail de thèse étant axé principalement sur l'utilisation de l'indium-111, et dans une vision plus large, des cations métalliques trivalents tels que le gallium, le lutétium ou l'yttrium, la majorité des exemples présentés ci-après porteront sur la chélation de ces métaux.

I.3.2.1 Stabilité thermodynamique

Le choix de l'agent chélatant nécessite de prendre en compte certains paramètres inhérents à ces molécules pouvant influencer la stabilité du complexe. Les facteurs à prendre en compte incluent la stabilité thermodynamique, la sélectivité de l'agent chélatant pour le métal, et la notion d'inertie cinétique, mais également les propriétés redox, la charge du complexe ou encore son caractère lipophile.

Le premier facteur à prendre en compte lors de la conception d'un complexe métallique radiopharmaceutique est la stabilité thermodynamique. Bien qu'elle n'indique pas nécessairement que le chélate aura rigoureusement le même comportement *in vivo*, elle reste tout de même souvent employée comme premier critère de sélection pour l'élaboration de produits pharmaceutiques. Elle est quantifiée par la mesure de la constante K_m . Cependant, cette valeur ne permet pas de comparer l'affinité de ligands ayant une denticité ou des propriétés acido-basiques différentes. La détermination de la concentration en métal libre non complexé par des méthodes de calcul de spéciation est alors préférable. Cette concentration, exprimée sous la forme logarithmique $p[M]$ (Équation I-1), permet de comparer quantitativement la capacité de plusieurs ligands à complexer un métal. Plus la valeur du $p[M]$ est élevée, plus le ligand est efficace. Un complexe présentant une constante faible sera sujet à des phénomènes de transchélation par d'autres systèmes (biomolécules compétitrices).

$$p[M] = -\log [M]_{\text{libre}}$$

$$p[M] = -\log \left([M]_{\text{tot}} - \sum [M_m L_l H_h] \right)$$

Équation I-1 : m, l, h correspondent respectivement aux coefficients stœchiométriques du métal, du ligand, et du proton.

Nous pouvons appliquer cette première approximation au cas des cations métalliques trivalents qui nous intéressent, notamment l'indium. L'indium est un métal de transition dont la forme soluble est à l'état d'oxydation +III. Ces cations métalliques sont connus pour se coordiner avec des espèces riches en électrons (neutre ou anioniques), dans lesquels le métal présente généralement une coordination de 6, 7 voire 8. On privilégie donc les ligands contenant des atomes donneurs tels que l'oxygène, l'azote, ou encore le soufre.

Comme tout marqueur radioactif, l'indium doit être complexé de façon stable et durable par un ligand adapté, afin d'éviter tout phénomène de transmétallation ou de transchélation *in vivo*. En effet, il a été démontré que certaines biomolécules telles que la transferrine (transporteur du fer) sont capable de piéger les éléments métalliques, et notamment le gallium et l'indium.^{127,128} Le développement de nouveaux agents chélatants s'est alors orienté vers la préparation d'espèces de plus en plus stables. Un grand nombre de ligands ont été testés pour la complexation des métaux de

transition et de post-transition, notamment ceux décrits par Martell et coll.^{129,130} ainsi que Harris et coll.^{127,131} qui ont montré que les ligands polyazotés porteurs de bras carboxylates présentent des pM élevés, faisant de ces molécules de bons candidats pour la chélation de l'indium.

Nous l'avons précisé précédemment, le DTPA est un groupe chélatant fort qui est utilisé comme chélate de l'indium formant des complexes octacoordinés.¹³² Cet agent chélatant est régulièrement utilisé en milieu clinique pour le marquage de peptides (Octréoscan[®]) et permet d'obtenir des rendements de marquage élevés avec une haute pureté radiochimique (>97 %). Cependant, ces complexes ont montré une faible stabilité *in vivo* pouvant conduire à des problèmes de transchélation ou de transmétallation. Afin de pallier cette lacune, de nouveaux systèmes dérivés du DTPA ont été développés en intégrant d'autres substituants au niveau du squelette carboné.^{71,133-135} Certains de ces dérivés sont également utilisés en clinique, notamment pour la radioimmunothérapie au Zévalin[®] (Ibritumomab – tiuxétan). Malgré une stabilité accrue du complexe, ces systèmes ne sont cependant pas optimaux.

Les chélates macrocycliques forment une autre classe de ligands. Les capacités complexantes de ces systèmes ont été démontrées très largement dans la littérature. Parmi tous les systèmes macrocycliques, les polyamines cycliques se sont révélées de très bons candidats pour la complexation de nombreux cations métalliques.¹³⁶⁻¹³⁹ Les principaux représentants de cette famille sont les tétraazacycloalcanes DOTA, TRITA et TETA correspondants aux versions fonctionnalisées par quatre bras acétate des macrocycles cyclène, 13aneN4 et cyclame respectivement. Les dérivés du triazacyclononane ou TACN, tels que le NOTA, sont également de bons complexant des métaux de transition comme le gallium ou le cuivre (Figure I-25).

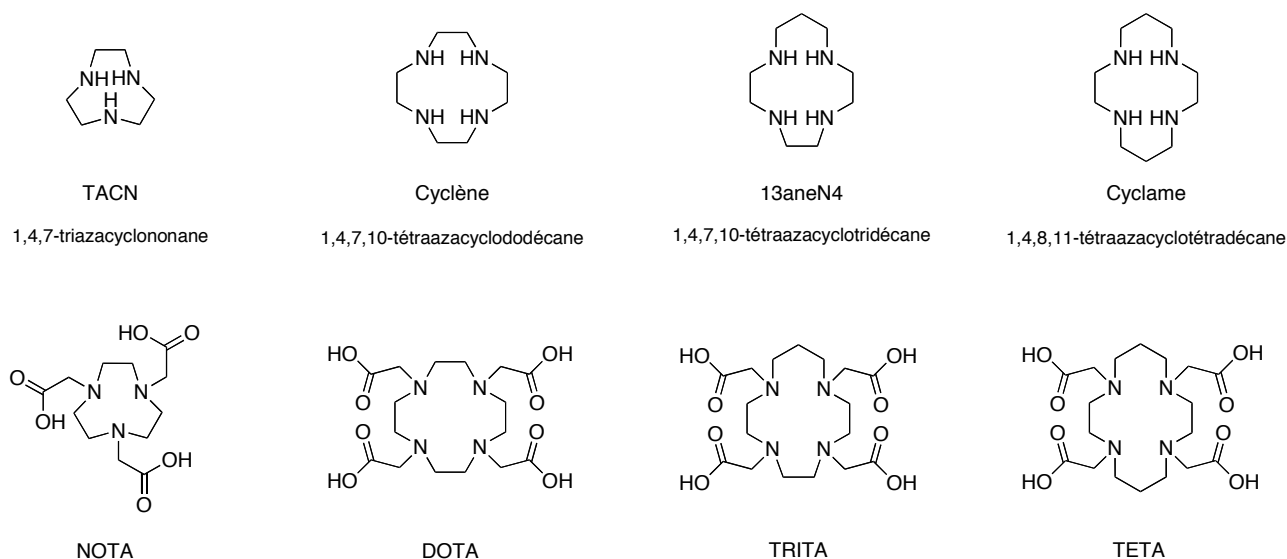


Figure I-25 : Principaux représentants de la famille des polyamines macrocycliques.

Les valeurs de pM des différents agents chélatants pour un métal donné peuvent alors être comparées directement, ce qui permet, en théorie, de choisir la molécule présentant les meilleures

propriétés de complexation. Le Tableau I-5 présente quelques ligands de polyaminocarboxylates et les valeurs des pM correspondant à leur complexe d'indium. Ces résultats tendent à montrer que l'EDASS, molécule linéaire hexadentate, a parmi les ligands représentés la meilleure affinité vis-à-vis de l'indium. Il n'existe cependant aucun exemple dans la littérature de biomolécule radiomarquée *via* cet agent chélatant.

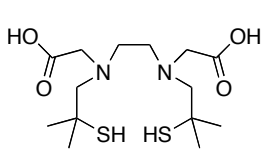
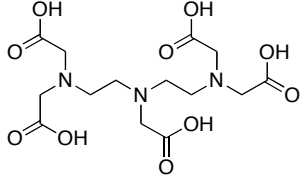
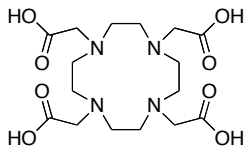
LIGANDS			TRANSFERRINE	
	EDASS	DTPA	18,3	DOTA
pM (In)	30,4	25,9	18,3	19,5

Tableau I-5 : Exemple d'agents chélatants linéaires ou macrocycliques et de leur affinité (pM) respective pour l'indium.

1.3.2.2 Inertie cinétique et effet macrocyclique

Si le pM est une valeur à ne pas négliger lors du choix de l'agent chélatant, les résultats expérimentaux de radiométallation soulèvent cependant quelques interrogations. En effet, on trouve dans la littérature de nombreux exemples attestant que les chélatés macrocycliques présentent une meilleure stabilité *in vivo* par rapport à leurs analogues linéaires.^{85,140,141}

Pour comprendre ces résultats, il faut prendre en compte un second paramètre : l'inertie cinétique des complexes vis-à-vis de la démétallation. Il est en effet important de déterminer si le complexe est susceptible de se dissocier pendant le temps de résidence dans l'organisme. Plus la stabilité cinétique du complexe est élevée, plus le risque de décomplexation du métal en présence d'ions compétiteurs (transmétallation) sera réduit. Dans le cas des macrocycles, une notion appelée "effet macrocyclique" entre également en jeu. Ce terme, introduit pour la première fois par Margerum en 1969,¹⁴² est utilisé pour désigner la propriété que possèdent les macrocycles de former des complexes métalliques beaucoup plus stables que ceux de leurs homologues linéaires.

La dissociation des complexes tétraazamacrocycliques en ligand libre et métal est un processus lent. La cinétique de dissociation est beaucoup moins rapide que celle des complexes de tétramines linéaires. Ainsi, une demi-vie de trente ans a été estimée pour le $[Ni(\text{cyclame})]^{2+}$ en milieu acide perchlorique 1 M alors que dans les complexes analogues de tétramines linéaires, la décooordination du métal intervient quasi instantanément dans les mêmes conditions.¹⁴³ De si faibles vitesses de dissociation sont l'expression de l'effet macrocyclique cinétique. L'inertie cinétique qui

en résulte est un atout si l'on veut développer des vecteurs à base de ligands macrocycliques, pour véhiculer *in vivo* des radionucléides. Elle permet en particulier d'éviter la décomplexation du métal en présence d'ions compétiteurs.

En imagerie médicale, les complexes de gadolinium de dérivés du DOTA commercialisés sous le nom de Dotarem[®] (Guerbet, France), Prohance[®] (Bracco, Italie), ou encore Gadovist[®] (Schering, Allemagne) ont d'ores et déjà été entérinés en tant qu'agents de contraste pour l'IRM (Figure I-26).^{8,9,144} Notons qu'en 2009, des rapports de l'agence européenne de pharmacovigilance (EMA) ainsi que de la U. S. Food and Drug Administration (FDA) ont mis en évidence une association entre une exposition aux complexes de gadolinium de dérivés du DTPA (Magnevist[®], MultiHance[®], Omniscan[®], OptiMARK[®]) et la survenue de fibroses néphrogéniques chez des patients en insuffisance rénale, ce qui pourrait être dû à un relargage du gadolinium *in vivo*, démontrant à nouveau l'intérêt d'utiliser les molécules cycliques plutôt que leurs analogues linéaires.

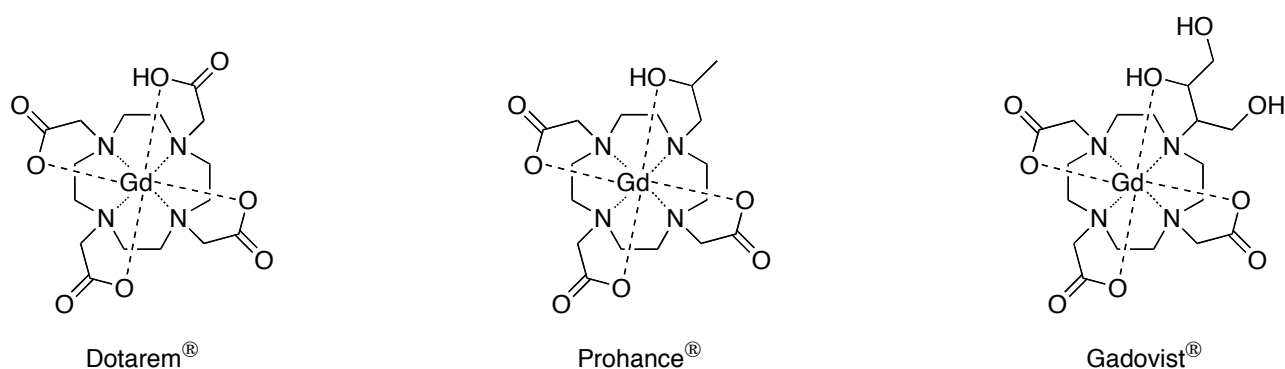


Figure I-26 : Exemples d'agents de contrastes dérivés du DOTA utilisés en IRM.

I.3.2.3 Taille du macrocycle et bras coordinants

Chaque cation métallique possède des propriétés et une taille qui lui sont propres, et il convient donc d'adapter la taille de la cavité macrocyclique et la nature des bras coordinants au métal choisi.

De nombreuses études physicochimiques et structurales ont été réalisées sur les complexes de polyazacycloalcanes destinés à l'imagerie TEMP/TEP et à la thérapie,^{145,146} notamment les dérivés du DOTA, qui se sont révélés être de bons complexants pour l'indium.^{147,148} On peut noter que des structures octacoordinées mettant en jeu les quatre atomes d'azote et les quatre fonctions carboxylate ont été rapportées pour certains dérivés du DOTA, comme le DOTA-AA qui forme un complexe octaédrique à l'état cristallin dans le cas de complexes d'indium ou d'yttrium.¹⁴⁹ Des études par RMN ont cependant montré que si le complexe d'yttrium reste octacoordiné en solution, le complexe d'indium devient heptacoordiné en solution, le bras acétamide ne participant plus à la sphère de coordination du métal. Ce système heptacoordiné a également été décrit pour des dérivés du DO3A, cyclène *N*-fonctionnalisé par trois bras acétate.¹⁵⁰

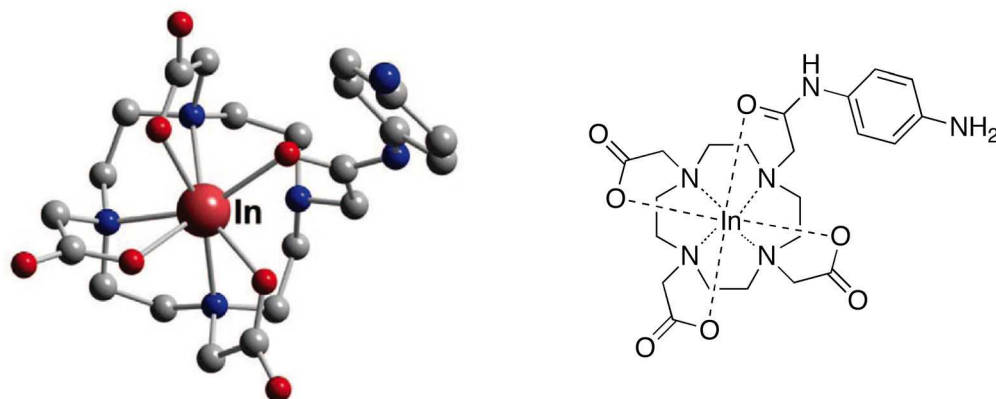


Figure I-27 : Structure du complexe In-DOTA-AA. Le métal est coordonné par les quatre atomes d'azote de la cavité macrocyclique, tandis que les trois fonctions carboxylate des groupements acétate et le carbonyle de la fonction amide viennent compléter la sphère de coordination.¹⁴⁹

Le gallium adopte généralement une géométrie hexacoordinée, et il a été montré que le NOTA est un chélatant de choix pour la séquestration de ce cation.¹⁵¹ En effet, la taille de la cage formée par le macrocycle et les bras acétates est parfaitement adaptée au rayon ionique du gallium (0,76 Å), ce qui confère à ce complexe une très grande stabilité et une résistance accrue à la démétallation.¹⁵² L'utilisation de macrocycles de taille supérieure tels que le DOTA ou le TETA pour la chélation du gallium conduit à des complexes de moins en moins stables.^{145,147}

Un agent chélatant est souvent sélectionné pour sa capacité à compléter la sphère de coordination du métal choisi, menant généralement à la formation de complexes neutres. Cependant, la formation de complexes chargés peut également être envisagée afin d'influer sur la biodistribution du radiotracer, notamment lors de l'utilisation de vecteurs peptidiques. Il a ainsi été rapporté que la biodistribution d'un dérivé de l'octréotide fonctionnalisé par un dérivé DOTA (DOTATOC) varie largement suivant le radionucléide utilisé (Figure I-28).¹⁵³ Dans cette étude, les complexes d'indium et d'yttrium mobilisant tous les bras acétates, les complexes formés sont donc neutres. En revanche, le gallium préférant un mode hexacoordiné, seuls deux bras acétates participent à la coordination du métal. Le radiotracer possède donc une charge positive, ce qui influe largement sur la biodistribution du peptide. Ce phénomène a également été observé lors du marquage à l'indium d'un affibody décoré par un dérivé DOTA ou un dérivé NODA.¹⁵⁴

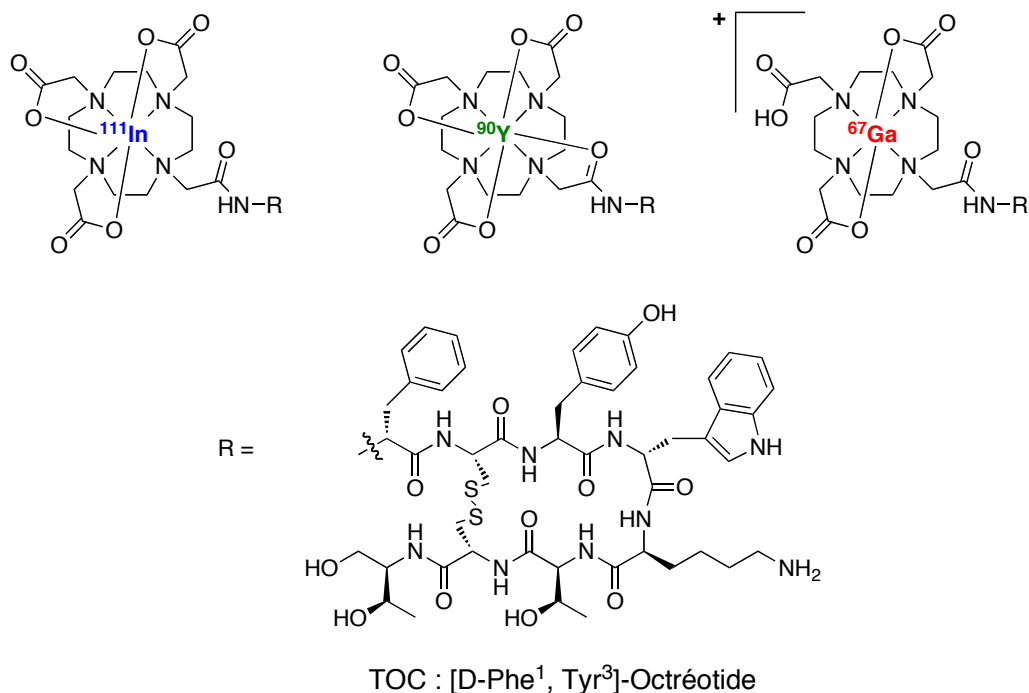


Figure I-28 : Évolution de la charge du radiotracer DOTATOC en fonction du radionucléide métallique utilisé.¹⁵³

D'autres dérivés macrocycliques portent des bras soufrés¹⁵⁵ ou phosphonates¹⁵⁶ au lieu de bras acétate, mais ne conduisent pas toujours à des résultats *in vivo* concluants malgré la grande stabilité des complexes formés.

Enfin, d'autres paramètres tels que le caractère lipophile ou le potentiel redox sont généralement moins importants, mais peuvent néanmoins dans certains cas influencer le choix du chélatant. Les phénomènes d'oxydoréduction doivent par exemple être pris en considération dans le cas de complexes de cuivre.

1.3.3 Fonctionnalisation des polyazamacrocycles pour la bioconjugaison

1.3.3.1 Fonctionnalisation des macrocycles

Les agents chélatants bifonctionnels macrocycliques possèdent par définition deux sortes de groupes fonctionnels, le premier pour compléter la sphère de coordination du métal et optimiser les propriétés chélatantes de la molécule, le second pour amener une fonction de greffage. L'accès à de tels composés impose alors de fonctionnaliser le macrocycle de base (cyclène, 13aneN4 ou cyclame) au niveau des atomes d'azote (*N*-fonctionnalisation) et/ou également au niveau du squelette carboné (*C*-fonctionnalisation).

Pour obtenir de tels composés, des méthodes de synthèse basées sur l'utilisation d'intermédiaires bisaminal ont été développées ces dernières années.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ Ces composés permettent à la fois d'accéder à divers macrocycles sélectivement *N*-fonctionnalisés et facilitent également l'introduction d'un groupement fonctionnel sur un atome de carbone.

La fonction aminal représente l'équivalent azoté de la fonction acétal ou mercaptal, obtenue par condensation d'une amine primaire ou secondaire sur une fonction aldéhyde ou cétone (Figure I-29).

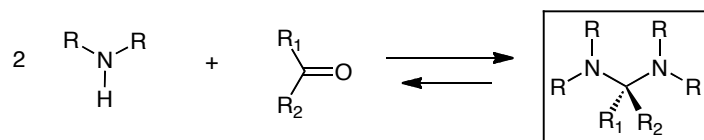


Figure I-29 : Formation d'une fonction aminal.

Au départ d'une polyamine comportant des chaînons éthyléniques ou propyléniques, on obtient des fonctions aminal cycliques. La formation de cycles à cinq ou six chaînons rend alors ces dérivés beaucoup plus stables thermodynamiquement que leurs analogues acycliques. Ces adduits aminal ont permis ces vingt dernières années des avancées notables dans la chimie des polyamines cycliques, en facilitant l'accès à de nombreux systèmes.¹⁶⁰⁻¹⁶² Ils sont aujourd'hui des intermédiaires clés tant pour la synthèse de macrocycles dits de "base" que pour leur fonctionnalisation.

I.3.3.1.1 *N*-fonctionnalisation sélective

Avant l'apparition de l'outil bisaminal, la plupart des approches de *N*-fonctionnalisation sélective nécessitaient soit de travailler avec un excès de macrocycle, soit de mettre en œuvre des méthodes fastidieuses de protection/déprotection des atomes d'azote.¹⁶³⁻¹⁶⁵ Ces dernières impliquent généralement des conditions de déprotection drastiques, ce qui limite considérablement la nature des groupes fonctionnels qui peuvent être introduits sur le macrocycle.

L'utilisation d'un "template organique" permet de rigidifier l'amine linéaire et ainsi la prédisposer favorablement pour la cyclisation. Lorsque l'on condense une tétraamine linéaire sur un dérivé α -dicarbonylé, on obtient un intermédiaire bisaminal tri-cyclique. L'action d'un dérivé bisélectrophile conduit à la fermeture du cycle (Schéma I-1).^{166,167} Il est à noter que la formation des différents isomères peut être contrôlée en modifiant judicieusement les conditions opératoires (température, solvant).^{160,161,168}

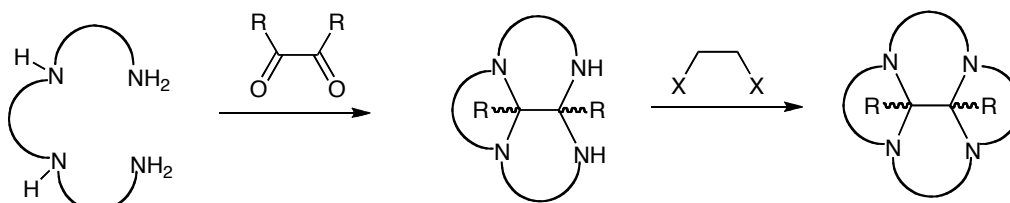


Schéma I-1

Différents macrocycles de base (cyclène, cyclame, 13aneN4) ont été ainsi préparés par condensation du glyoxal,^{169,170} de l'aldéhyde pyruvique¹⁵⁷ et de la butanedione¹⁶⁷ sur une tétraamine linéaire.

La méthode mettant en jeu des intermédiaires de type bisaminal s'avère d'un grand intérêt pour la synthèse de macrocycles régiosélectivement *N*-fonctionnalisés. Les intermédiaires bisaminal issus de la condensation du glyoxal sont particulièrement intéressants si l'on cherche à introduire une ou deux fonctions de greffage pour la bioconjugaison, car ils permettent d'accéder à des intermédiaires mono- ou di-protégés. En effet, en utilisant comme agent électrophile le bromure de benzyle, il est possible de protéger sélectivement un seul ou deux atomes d'azote du macrocycle par quaternisation. Après élimination du pont bisaminal, il est alors possible de fonctionnaliser les autres atomes d'azote du macrocycle afin d'accéder facilement à des macrocycles di- ou tri-fonctionnalisés tels que le DO2A^tBu ou le DO3A^tBu (Schéma I-2).

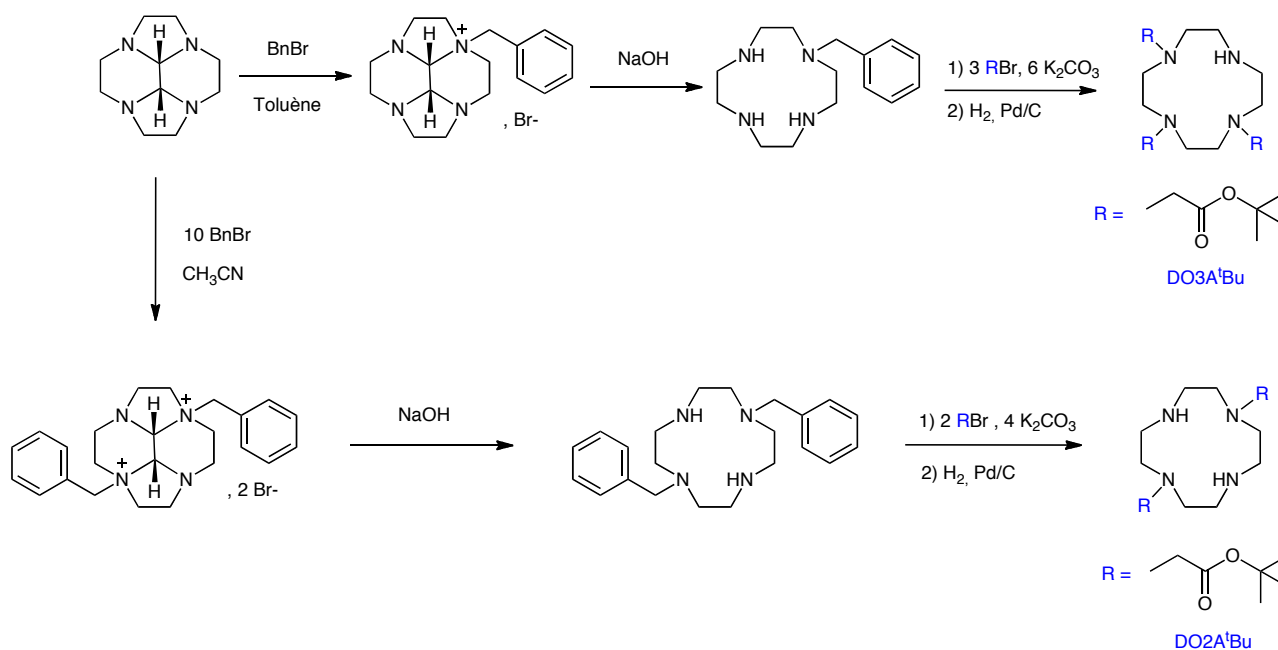
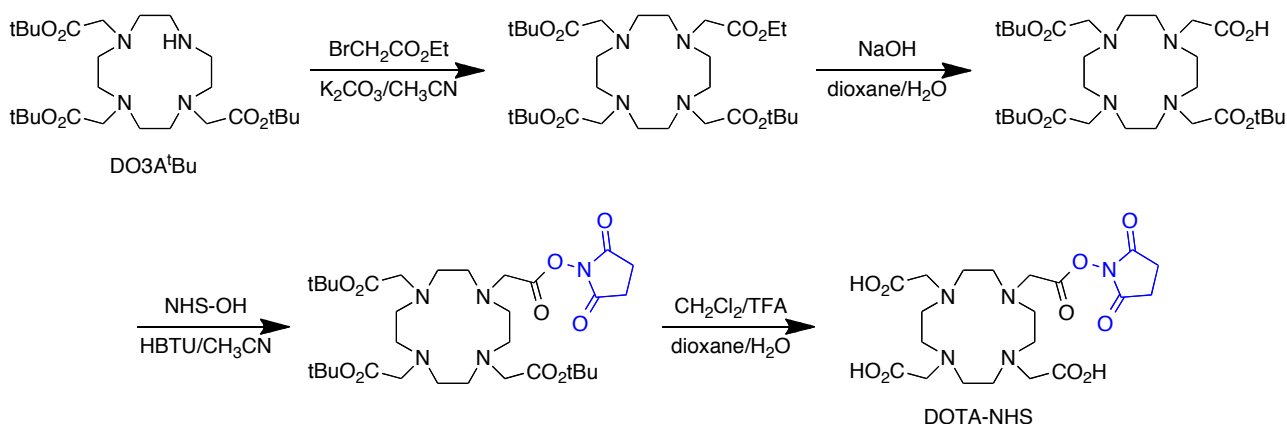


Schéma I-2

Il est ensuite aisé d'introduire une ou deux fonctions de greffage *via* les amines secondaires libres. Par exemple, le DOTA-NHS peut être préparé par réaction du bromoacétate d'éthyle avec le DO3A^tBu pour conduire à un intermédiaire tétra-fonctionnalisé (Schéma I-3).⁸⁹ Il est ensuite possible de déprotéger sélectivement une seule fonction acétate par saponification de l'ester

éthylrique avant de former la fonction ester activée. Cette espèce activée peut ensuite être greffée telle quelle dans le cadre d'une synthèse peptidique, ou après clivage des groupements tert-butyles pour un greffage sur un anticorps par exemple.

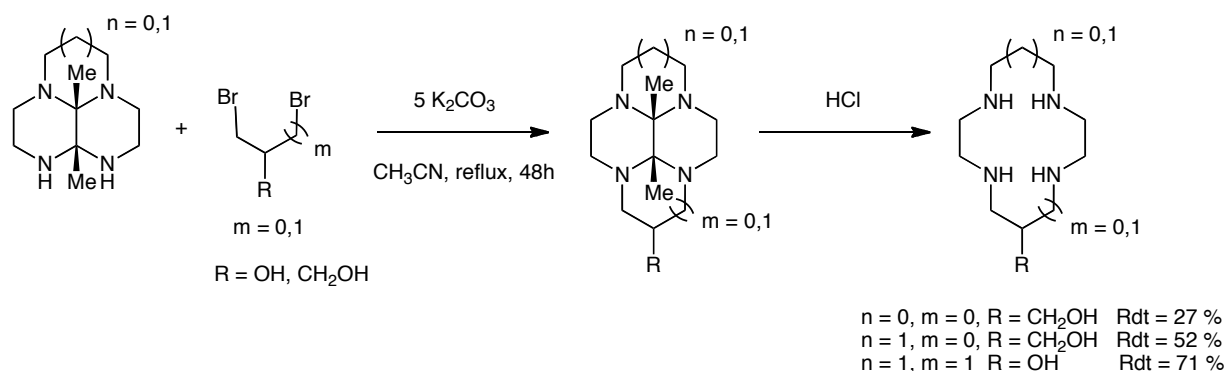


I.3.3.1.2 C-fonctionnalisation

L'introduction de la fonction de greffage sur le squelette carboné représente une tâche beaucoup plus ardue. En effet, la fonctionnalisation ne pouvant être réalisée par couplage C-C, la synthèse de ces dérivés implique généralement l'utilisation de synthons bisélectrophiles portant la fonctionnalité désirée (ou l'intermédiaire permettant d'accéder au système C-fonctionnalisé souhaité).¹⁷¹⁻¹⁷³ Dans les nombreux travaux décrits dans la littérature, l'étape de cyclisation reste délicate et les rendements sont généralement faibles.

Les intermédiaires bisaminal ont également été sollicités pour la synthèse de composé C-fonctionnalisés. La préorganisation du précurseur linéaire permet d'éviter l'utilisation d'un template métallique ou le recours à des groupements tosyloxy,¹⁷¹ les conditions drastiques de déprotection utilisées pour ces deux méthodes limitant considérablement le choix du groupe fonctionnel introduit. Par ailleurs, les temps de réaction de l'étape de cyclisation relativement courts et les rendements de réaction très satisfaisants rendent l'approche bisaminal bien plus avantageuse que la synthèse de Tabushi,¹⁷² méthode utilisée jusqu'alors pour préparer des cyclames ou 13aneN4 C-fonctionnalisés. De nouveaux macrocycles précurseurs d'agents chélatants bifonctionnels ont ainsi été préparés au sein du laboratoire au départ de différentes tétraamines (Figure I-30),^{157,158,162} mais elles impliquent encore souvent la préparation préalable du synthon C-fonctionnalisé désiré lorsque celui-ci n'est pas commercial.

Il est à noter que de nouveaux macrocycles C-fonctionnalisés par une fonction amine primaire ont été synthétisés au laboratoire par une méthode simple et efficace faisant appel aux dérivés bisaminal.¹⁵⁹

Figure I-30 : Exemples de composés C-fonctionnalisés obtenus via l'outil bisaminal.¹⁶²

I.3.3.2 Agents chélatants bifonctionnels à base de polyamines macrocycliques

Ces méthodes de fonctionnalisation ont été appliquées avec succès lors du développement d'agents chélatants bifonctionnels macrocycliques. De nombreux agents chélatants bifonctionnels basés sur des macrocycles azotés ont déjà été décrits dans la littérature.^{89,101,174-180} La Figure I-31 regroupe les principaux agents chélatants bifonctionnels macrocycliques utilisés en imagerie médicale. Ils diffèrent par la taille de la cavité macrocyclique mais également par la nature et la position (N- ou C-fonctionnalisation) de la fonction de greffage.

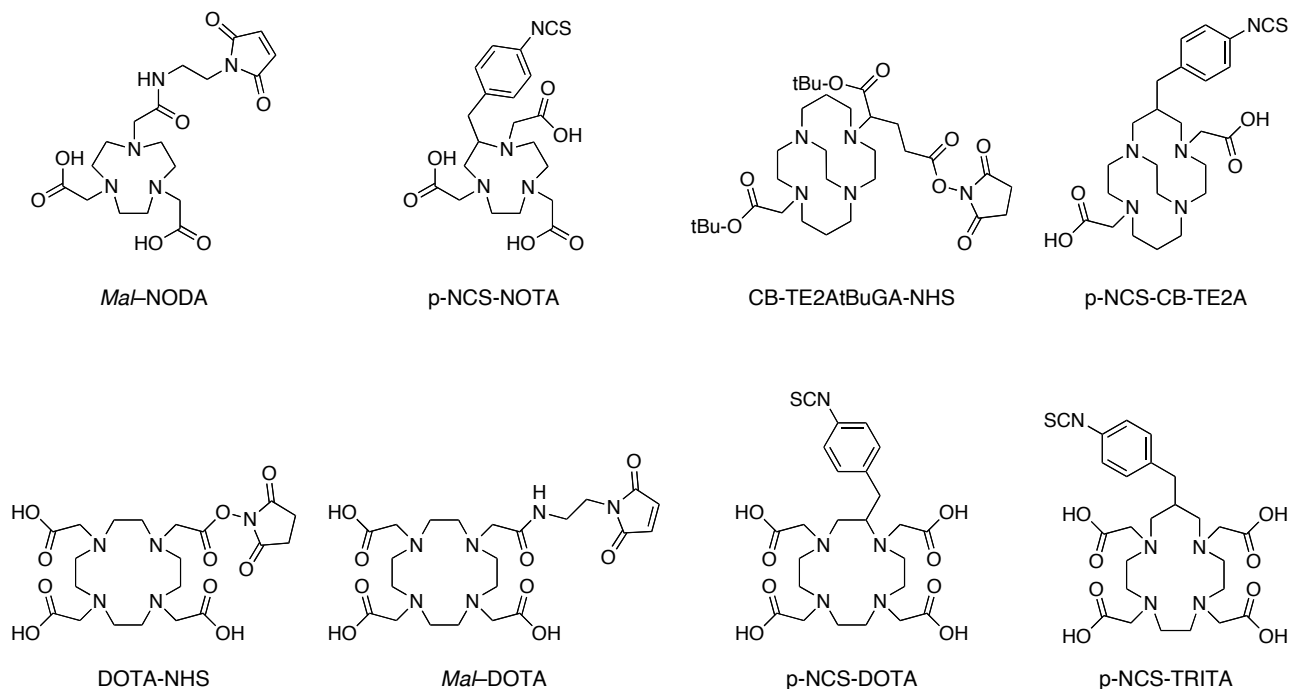


Figure I-31 : Exemples d'agents chélatants bifonctionnels macrocycliques.

Les différents systèmes présentés ci-dessus ont largement été utilisés pour le marquage de protéines telles que les anticorps,¹⁸¹⁻¹⁸³ mais également en synthèse peptidique comme pour le marquage de dérivés de l'octréotide ou d'affibodies.^{28,154,178,180,184-187} Tous ces systèmes ont fait la

preuve de leur efficacité et ont démontré une excellente stabilité des complexes radiométalliques macrocycliques.

I.4 Présentation de Pharm'Image et objectifs du travail de thèse

Notre projet de recherche s'inscrit dans le cadre du projet scientifique du groupe d'intérêt économique (GIE) Pharm'Image. Ce projet transversal regroupe différents acteurs scientifiques des secteurs public et privé, et est axé sur l'utilisation, la mise au point de traceurs et la détermination de biomarqueurs capables de permettre le diagnostic de pathologies, le suivi de l'efficacité des traitements et la sélection de molécules plus actives. Une des thématiques majeure de ce projet collaboratif est le développement. Dans ce contexte, notre laboratoire intervient notamment dans l'élaboration de traceurs innovants à base de polyamines cycliques, et plus récemment dans le greffage d'agents bifonctionnels chélatants sur des vecteurs biologiques pour leur utilisation en imagerie médicale. Le développement de tels systèmes représente aujourd'hui un réel défi.

Ce travail de thèse s'articule en deux grandes parties :

1^{ère} PARTIE :

La première partie de notre travail a été axée sur la synthèse d'un dérivé macrocyclique bifonctionnel permettant un greffage simple et rapide sur une biomolécule d'intérêt. La synthèse de dérivés multimodaux porteurs à la fois d'une partie chélatante, d'un fluorophore et d'une fonction de greffage a également été envisagée.

2nde PARTIE :

La seconde partie de ce manuscrit est consacrée au greffage d'agents chélatants bifonctionnels sur différentes biomolécule et peut donc être subdivisée en trois sections.

Une partie des travaux de recherche présentés dans ce manuscrit porte sur le greffage et la radioméallation d'un macrocycle azoté dérivé du DOTA sur des anticorps monoclonaux entiers utilisés en oncologie (Figure I-32). Une attention particulière a été apportée à la caractérisation de ces composés avant radiomarquage, puis à l'optimisation de la méallation afin d'obtenir un composé avec une haute pureté radiochimique. Ces différents immunoconjugués ont fait l'objet de tests *in vitro* avant d'être utilisés en imagerie sur le petit animal.

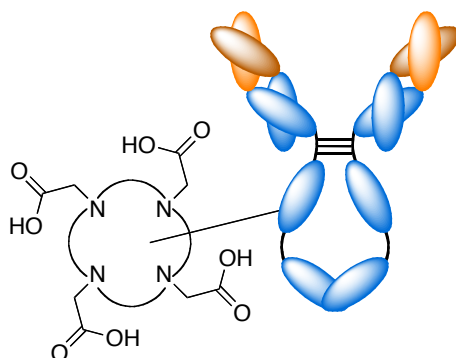


Figure I-32 : Schéma d'un anticorps immunoconjugué

Nous avons également envisagé le greffage d'un dérivé DOTA sur un fragment Fab utilisé notamment en cardiologie. Nous nous sommes efforcés de mettre au point des conditions de greffage adaptées à ce type de protéine, dans le but de contrôler au mieux le taux de greffage de dérivés macrocycliques sur la biomolécule. Ici aussi, de nombreux efforts ont été consentis afin de mieux déterminer le site de greffage à l'aide de méthodes de caractérisation adéquates. Nous présenterons également une méthode de greffage optimisée nous permettant de conserver l'activité biologique de l'anticorps avant radiomarquage.

Enfin, nous nous sommes intéressés au marquage d'un agent pro-inflammatoire par un agent multimodal nous permettant un d'étudier le métabolisme de la biomolécule par TEMP et par imagerie optique de fluorescence.

Chapitre II :

Synthèse d'agents chélatants bifonctionnels à base de polyamines macrocycliques

II. Synthèse d'agents chélatants bifonctionnels à base de polyamines macrocycliques

II.1 Introduction d'une fonction anhydride cyclique

Nous l'avons évoqué dans le chapitre I, le DTPA est largement utilisé en scintigraphie pour la chélation de l'indium-111. L'un des premiers DTPA utilisé en immunoscintigraphie a été le DTPA dianhydride,^{87,188} dont la synthèse aisée et la facilité de mise en œuvre en ont fait pendant longtemps un des agents chélatants bifonctionnels les plus employés. En outre, il reste le seul exemple de dérivés du DTPA dont la fonction de greffage est un anhydride cyclique. Avant d'aller plus avant dans la synthèse de dérivés macrocycliques, nous avons décidé d'optimiser la synthèse du DTPA dianhydride. En effet, bien que ce réactif soit commercial et que sa synthèse soit largement décrite dans la littérature, il est important de déterminer au laboratoire les conditions nécessaires à la formation de la fonction anhydride cyclique.

La synthèse du composé **1** a donc été réalisée dans des conditions similaires à celles décrites dans la littérature.¹⁸⁹ La formation des deux fonctions anhydride est favorisée par la prédisposition des bras acétate formant des cycles à six chaînons. Le chauffage du DTPA en présence d'anhydride acétique et de pyridine sous atmosphère inerte permet la formation du composé **1** avec un excellent rendement (Schéma II-1).

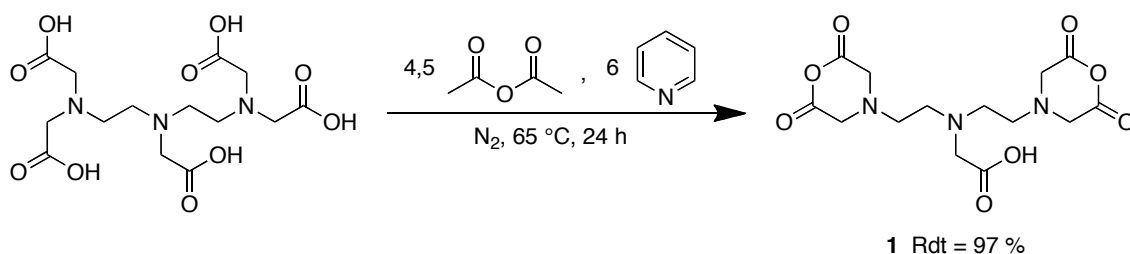


Schéma II-1

Cette molécule est aisément caractérisable par spectroscopie de RMN ¹H qui atteste de la conversion totale du DTPA en DTPA dianhydride (Figure II-1).

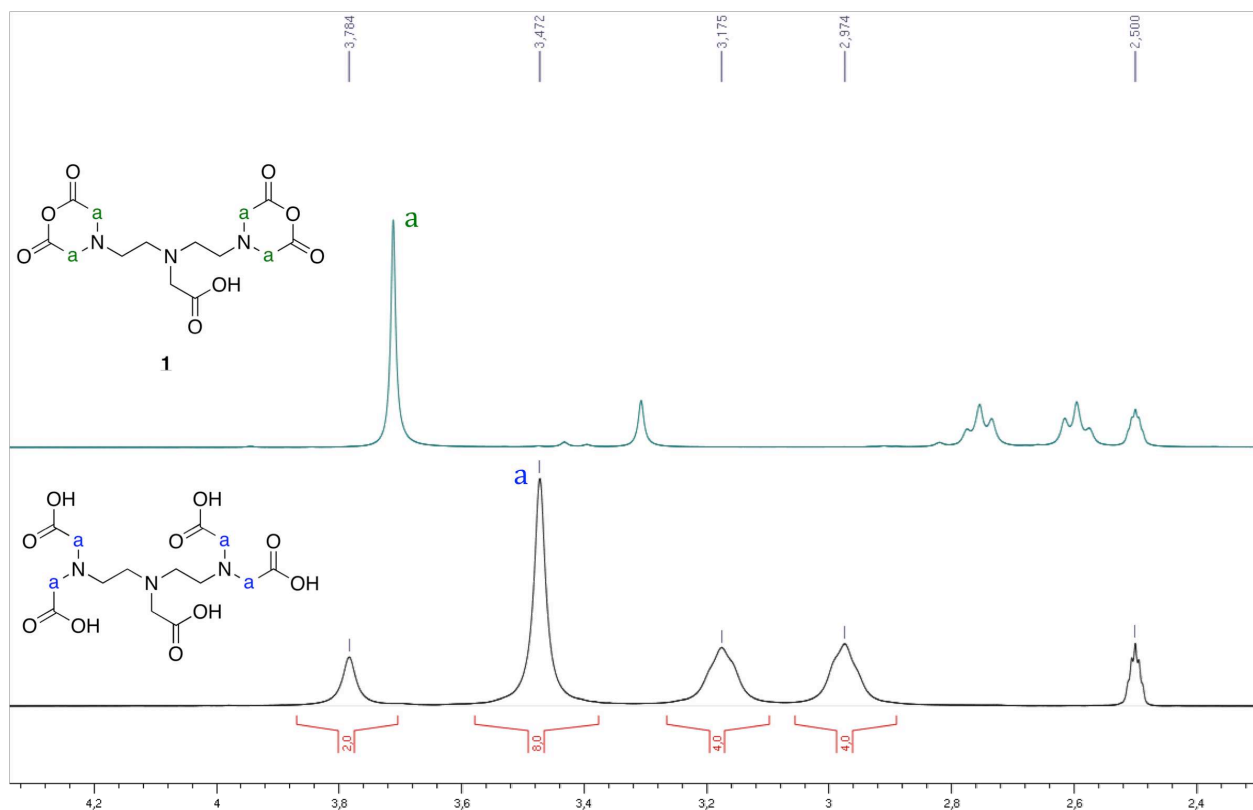


Figure II-1 : Spectres RMN ^1H (DMSO, 300 MHz, 300 K) du DTPA et du composé **1**.

Ces premiers essais nous ont permis de déterminer les conditions optimales de formation d'une fonction anhydride cyclique, en vue de les appliquer à la synthèse d'un analogue en série macrocyclique.

II.2 Synthèse du système DOTAGA-anhydride

Bien que sa synthèse soit aisée et quasi quantitative, le DTPA dianhydride souffre d'inconvénients qui en font un outil limité. En effet, cette molécule possédant deux fonctions de greffage, il est difficile d'éviter la formation de dimères, voire d'agrégats de protéines lors du greffage de l'agent bifonctionnel (Figure II-2). De plus, des phénomènes de transchélation/transmétallation ont été observés sur des radioimmunoconjugués utilisant le DTPA comme agent chélatant, soulignant ainsi le manque de stabilité *in vivo* des complexes linéaires.^{85,140}

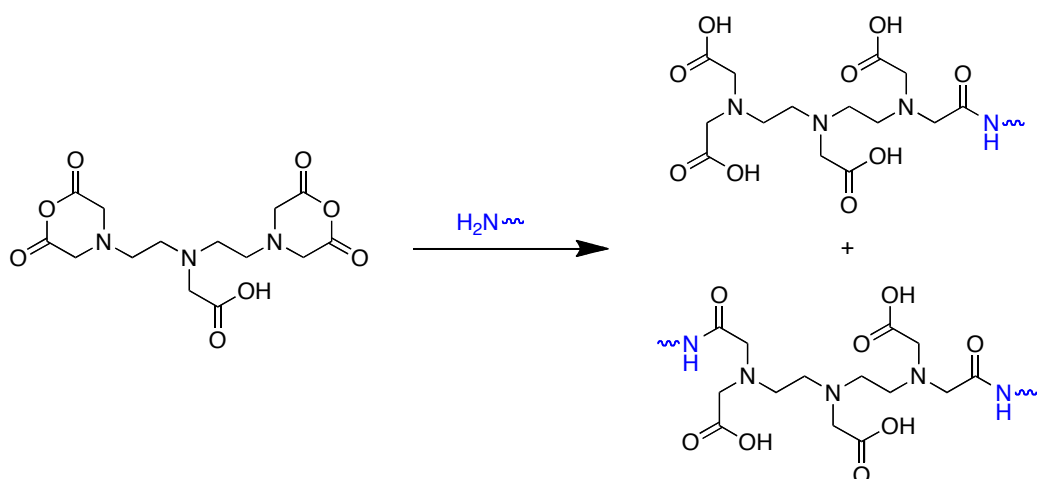


Figure II-2 : Produits attendus lors de l'attaque nucléophile d'une amine primaire sur le DTPA bisanhydride.

Notons qu'il n'existe aucun système équivalent dans la famille des polyamines cycliques. Pourtant, cette approche présente l'avantage de ne nécessiter aucun agent de couplage et de ne générer aucun produit secondaire après couplage. De plus, cette fonction très réactive permet de réaliser des couplages rapides dans des conditions douces.

Prenant appui sur ces travaux, la synthèse d'un tel système a récemment été réalisée au laboratoire⁸⁴ en partant du DOTAGA (l'acronyme GA signifie "glutaric acid"), obtenu par réaction d'un dérivé de l'acide glutarique sur la fonction amine secondaire du DO3AtBu.^{190,191} Le DOTAGA a récemment été utilisé sous forme de complexe de gadolinium en tant qu'agent de contraste pour l'IRM,^{12,192,193,194} mais également sous forme de complexe d'indium ou de gallium pour le marquage de cyclopeptides pour la TEMP et la TEP.¹⁹⁵ L'attrait majeur de cette molécule s'explique par la présence d'une fonction acide carboxylique supplémentaire par rapport au DOTA, ce qui permet de conserver après greffage quatre fonctions carboxylate pour la complexation du métal. Si cette caractéristique n'est pas toujours cruciale pour la complexation de l'indium ou du gallium, les complexes d'yttrium gagnent en stabilité s'ils sont octacoordinés.

La prédisposition à la cyclisation du bras dérivé de l'acide glutarique nous a permis d'accéder aisément à un dérivé activé que nous appellerons par la suite composé **2** ou DOTAGA-anhydride (Schéma II-2). Le chauffage du DOTAGA en présence d'anhydride acétique et de pyridine permet d'accéder au composé **2** avec un rendement quasi quantitatif.

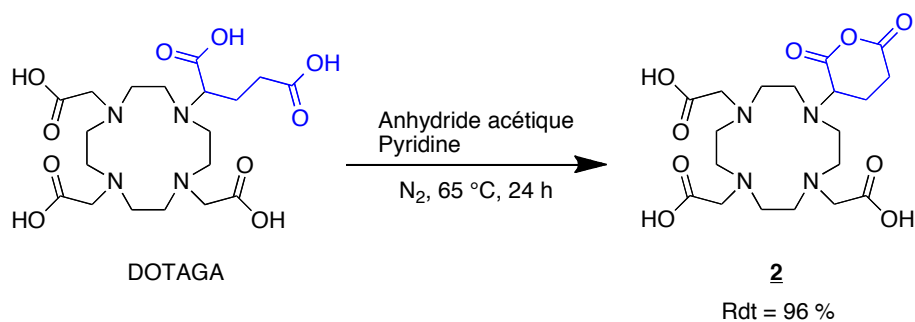
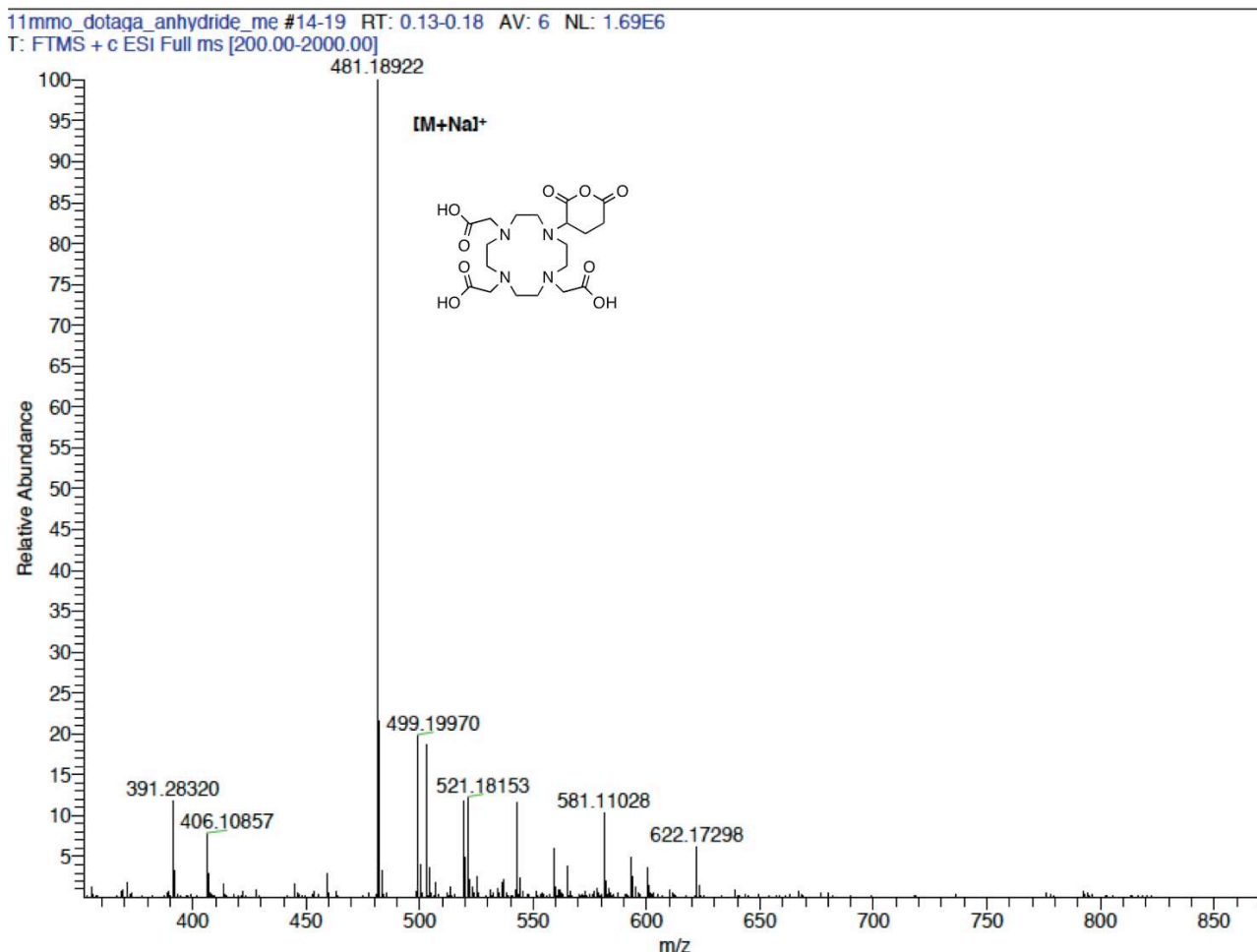


Schéma II-2

Bien que l'hydrolyse de la fonction anhydride du composé **2** soit rapide, la formation du composé a pu être confirmée par spectrométrie de masse ESI-MS (Figure II-3). En effet, le pic observé à $m/z = 481,19$ correspond à l'espèce $[M+Na]^+$.

Figure II-3 : Spectre de masse Electrospray après formation du composé **2**.

Le composé n'étant pas soluble dans les solvants deutérés autres que l'eau lourde, il n'est pas envisageable de le caractériser par les méthodes spectroscopiques habituelles. En effet, les expériences de RMN réalisées montrent clairement la présence des deux espèces cyclisée et ouvertes (hydrolysée) deux minutes seulement après la mise en solution du composé **2** (Figure II-4).

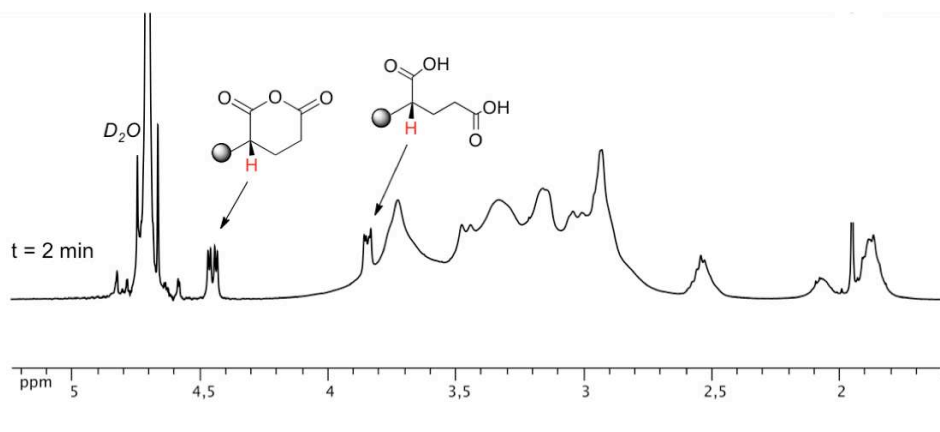


Figure II-4 : Spectre RMN ^1H (D_2O , 500 MHz, 293 K) du composé **1** 2 minutes après solubilisation.

La pureté du composé **2** a donc été déterminée par réaction de deux équivalents de propylamine (le deuxième équivalent forme un contre-ion propylamonium) sur la fonction anhydride cyclique, et le produit de la réaction a ensuite été analysé par HPLC. La Figure II-5 présente les chromatogrammes du DOTAGA ($t_r = 5,72$ min) et du produit de l'ouverture du composé **2** par la propylamine ($t_r = 6,39$ min). L'intégration des pics indique une conversion de 96 % en anhydride. Des analyses par spectrométrie de masse ont permis de prouver la formation de ce "DOTAGA-propylamine". Des études de spectroscopie de RMN à une et deux dimensions sont venues confirmer ces résultats.

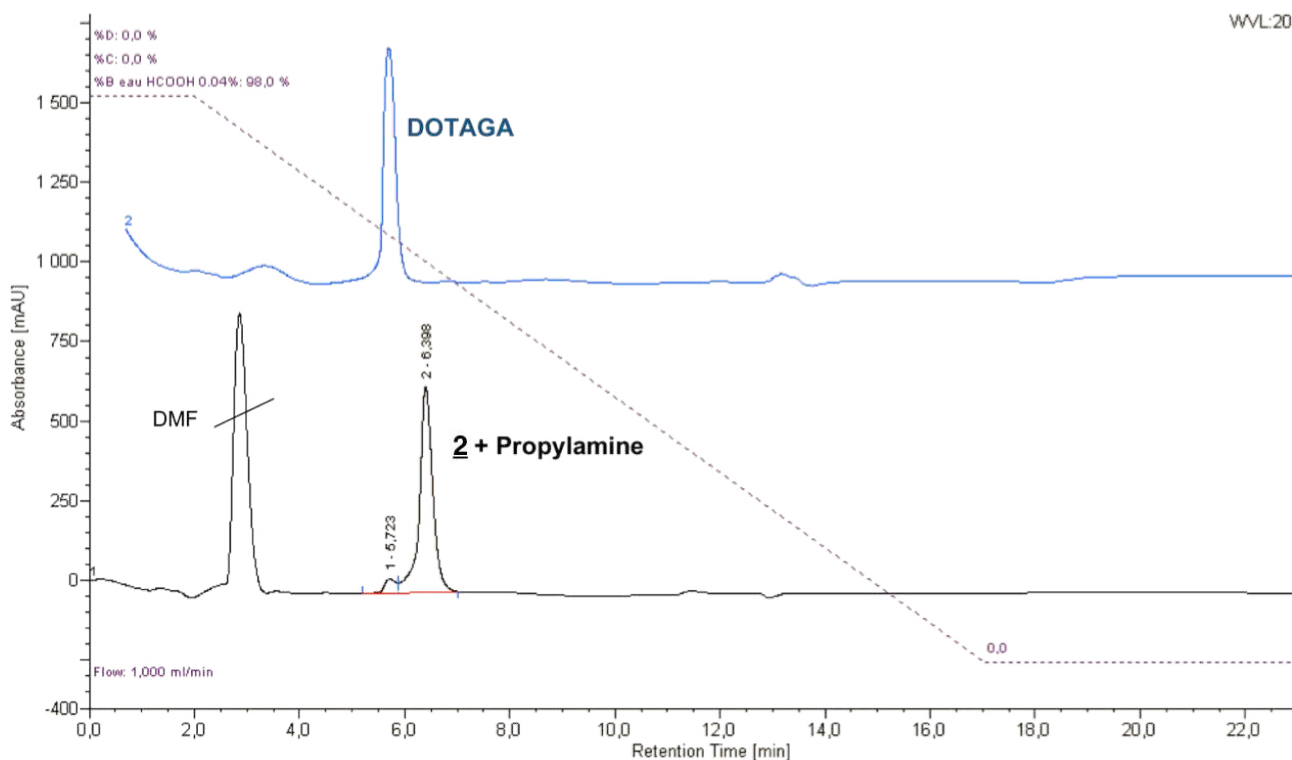


Figure II-5 : Analyse HPLC après ouverture du composé **2** (A : H_2O (0,4 % HCOOH), B : CH_3CN , gradient 2 % B \rightarrow 100 % B), (UV = 215 nm).

La fonction anhydride du produit étant dissymétrique, son ouverture sur la propylamine est susceptible de conduire à un mélange de deux composés. De nombreuses études par spectroscopie de RMN ont été réalisées et ont permis de prouver que la réaction d'ouverture de l'anhydride est régiosélective et conduit uniquement au produit portant la fonction amide sur le bras butanoate (Schéma II-3).⁸⁴

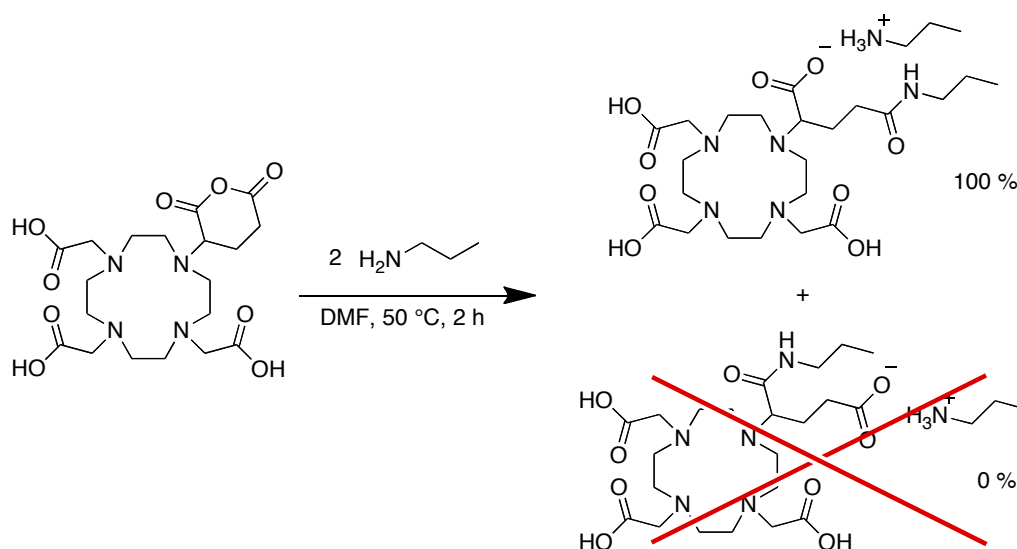


Schéma II-3

La modélisation moléculaire du composé **2** (Figure II-6) a permis d'apporter une explication à cette sélectivité. D'après la vue CPK, l'attaque sélective de la fonction amine primaire de la propylamine pourrait s'expliquer par une plus grande accessibilité de l'atome de carbone C1, qui contrairement à C2, n'est pas confronté à la gêne stérique du macrocycle. Cette hypothèse a été confirmée par des études de RMN à deux dimensions (NOESY, HMQC et HMBC).

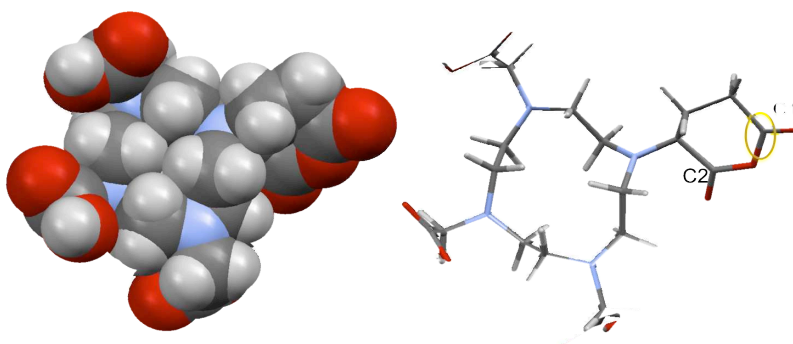


Figure II-6 : Vue CPK et représentation modélisée du DOTAGA-anhydride (méthode semi-empirique RM1 réalisée avec le logiciel HyperChem).

Il a donc été possible de réaliser au laboratoire la synthèse d'un dérivé macrocyclique porteur d'une fonction anhydride, en seulement trois étapes à partir du DO3A^tBu. Nous disposons donc d'un analogue macrocyclique du DTPA dianhydride, présentant l'avantage de ne posséder qu'une

seule fonction de greffage et donc d'éviter ainsi la formation d'agrégats protéiques après greffage. Le greffage du composé **2** sur des biomolécules sera décrit par la suite dans le chapitre 3.

II.3 Synthèse de précurseurs bimodaux

Nous l'avons évoqué précédemment, l'intégration d'une seconde modalité sur un seul et même traceur trouve de nombreuses applications en imagerie *in vivo* comme *in vitro*. L'intégration de deux marqueurs sur une seule molécule présente l'avantage de tirer profit de chacune des modalités d'imagerie, mais également d'assurer une biodistribution identique des deux sondes et d'éviter l'accumulation des toxicités intrinsèques à chaque marqueur. Le couplage de la TEMP et de l'imagerie optique fait de plus en plus l'objet d'études, et de nouvelles sondes imageantes monomoléculaires présentant à la fois un fluorophore et un marqueur radioactif ont fait leur apparition.^{47,196-199} En effet, si chaque technique d'imagerie possède ses avantages, leurs limitations sont également à prendre en considération. Dans le cas de la TEMP, la durée de l'étude sera ainsi conditionnée par la période du radionucléide utilisé, tandis que l'imagerie par fluorescence souffre d'une pénétrabilité limitée. La combinaison de ces deux techniques d'imagerie de sensibilités comparables permet alors une co-validation ou une consolidation de l'interprétation du phénomène observé.

II.3.1 Synthèse d'un dérivé DOTA-fluorescéine anhydride

II.3.1.1 Choix des différents constituants

Dans un souci d'homogénéité et de comparaison entre les différents marqueurs synthétisés, nous avons choisi de synthétiser un agent bimodal porteur d'une fonction de greffage anhydride cyclique.

La molécule synthétisée est destinée à être utilisée en TEMP et il est donc nécessaire d'intégrer un agent chélatant permettant une complexation efficace du radiométal. Nous avons donc logiquement choisi un dérivé du DOTA pour la chélation d'un radionucléide tel que l'indium-111.

La fluorescéine est un fluorophore organique très largement utilisé dans le domaine de la biologie.^{59,200,201} Le dérivé de la fluorescéine le plus utilisé dans ce secteur est la fluorescéine isothiocyanate (FITC), dont la fonction de greffage isothiocyanate permet son greffage sur des résidus lysine. Cette molécule sert notamment au marquage d'anticorps utilisés en imagerie cellulaire.²⁰²⁻²⁰⁴ La fluorescéine possède l'avantage de présenter une bonne hydrosolubilité, mais surtout un rendement de fluorescence (rendement quantique) très élevé, permettant une détection de

la fluorescence à des concentrations extrêmement faibles. Nous avons donc logiquement choisi ce fluorophore comme brique moléculaire pour l'imagerie optique.

Enfin, l'utilisation d'un espaceur (linker) porteur de fonctions réactives est nécessaire afin de lier les différentes "briques" en une seule molécule. Nous avons choisi d'utiliser un dérivé de la lysine, dont les deux fonctions amine primaire et la fonction acide carboxylique permettront l'insertion de chaque groupe fonctionnel.

Notons que des systèmes DOTA-fluorescéine monomoléculaires ont déjà été introduits par synthèse peptidique supportée sur des vecteurs biologiques dérivés de l'octréotide ou de la bombésine.⁴⁶ Cependant, aucune synthèse en solution de ces systèmes multimodaux possédant une fonction de greffage n'a été décrite à notre connaissance.

II.3.1.2 Synthèse de la sonde multimodale

La synthèse de la sonde bimodale peut se résumer en l'assemblage des différents éléments cités précédemment. La Figure II-7 schématise cet assemblage pour obtenir la molécule cible.

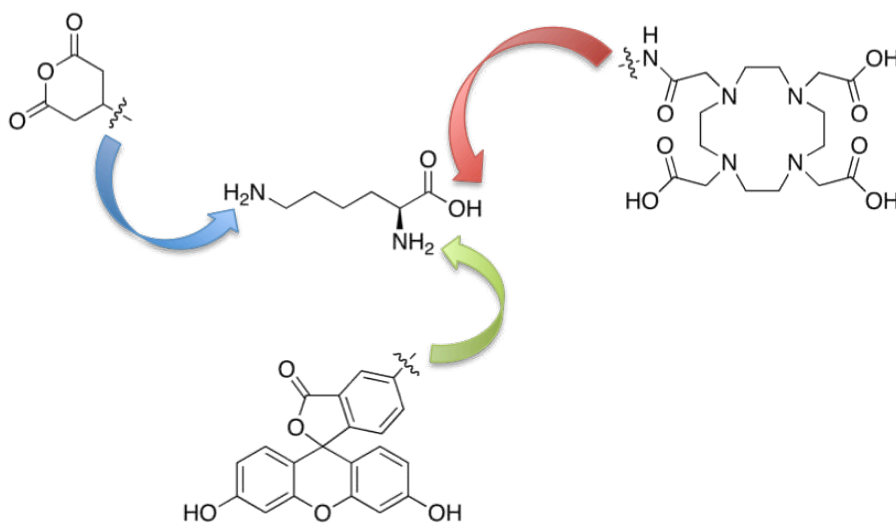


Figure II-7 : Assemblage envisagé de l'agent bimodal.

En partant de la *N*α-(carbobenzyloxy)-L-lysine (L-Lys(Z)-OH) commerciale, nous avons dans un premier temps réalisé la *N*-alkylation de la fonction amine primaire libre par action de deux équivalents de bromoacétate de tert-butyle en présence d'un excès de base organique, dans un mélange eau/acétonitrile.²⁰⁵ L'introduction de l'agent chélatant a ensuite été réalisée par couplage peptidique entre la fonction acide carboxylique du composé **3** et la fonction amine primaire du DO3A'Bu-*N*-(2-aminoéthyl)éthanamide pour former le composé **4** avec un bon rendement (Schéma II-4). Dans le cadre d'une utilisation en TEMP, et sachant que ces systèmes ne sont pas voués à être

utilisés en radioimmunothérapie, il n'est pas nécessaire de conserver quatre bras acétate pour la chélation d'un radionucléide trivalent tel que l'indium.

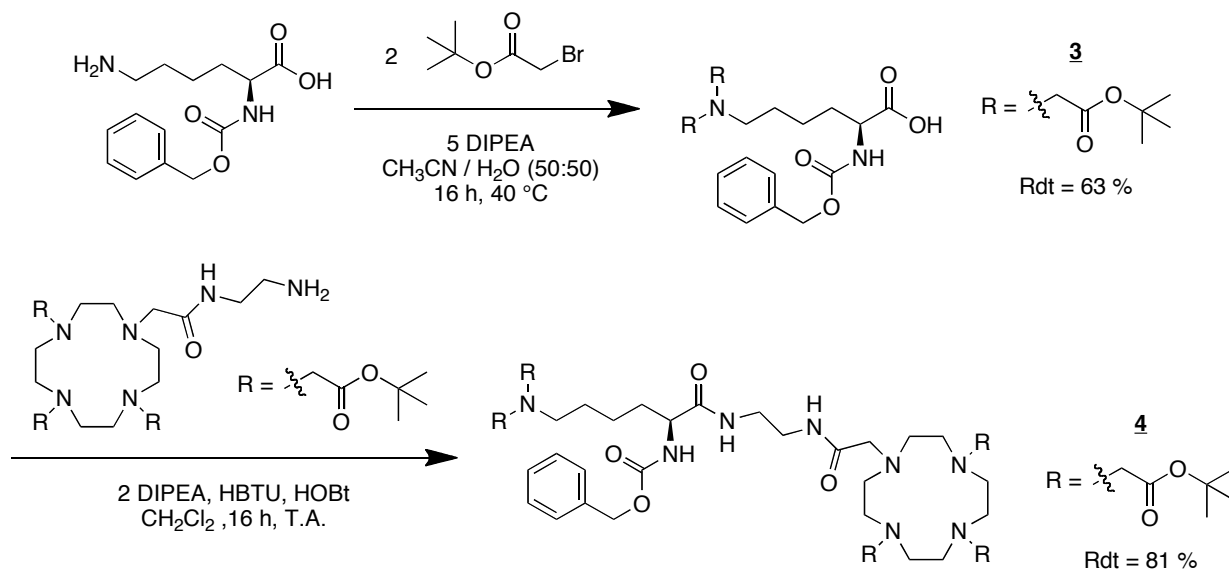


Schéma II-4

La déprotection de la fonction amine primaire par hydrogénolyse paladocatalysée permet d'accéder au composé **5** avec un rendement de 93 % (Schéma II-5).

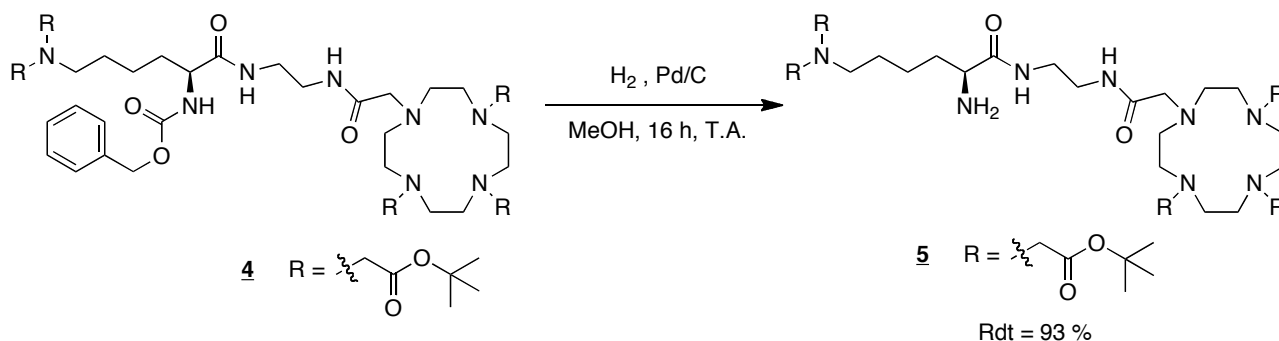


Schéma II-5

L'analyse des spectres RMN ^1H et ^{13}C des composés **4** et **5** enregistrés à 353 K dans le DMSO- d_6 à une fréquence de 600 MHz a permis de confirmer la formation du composé désiré (Figure II-8). La disparition des signaux entre 7,25 et 7,42 ppm (protons aromatiques), du singulet (NH) à 6,92 ppm, et des deux doublets (CH_2) à 5,06 et 5,02 ppm prouve la déprotection du carbamate de benzyle en amine primaire sans aucune ambiguïté. On peut également noter le blindage du multiplet à 3,94 ppm intégrant pour un 1H qui correspond au proton en position α du carbonyle du dérivé de la lysine.

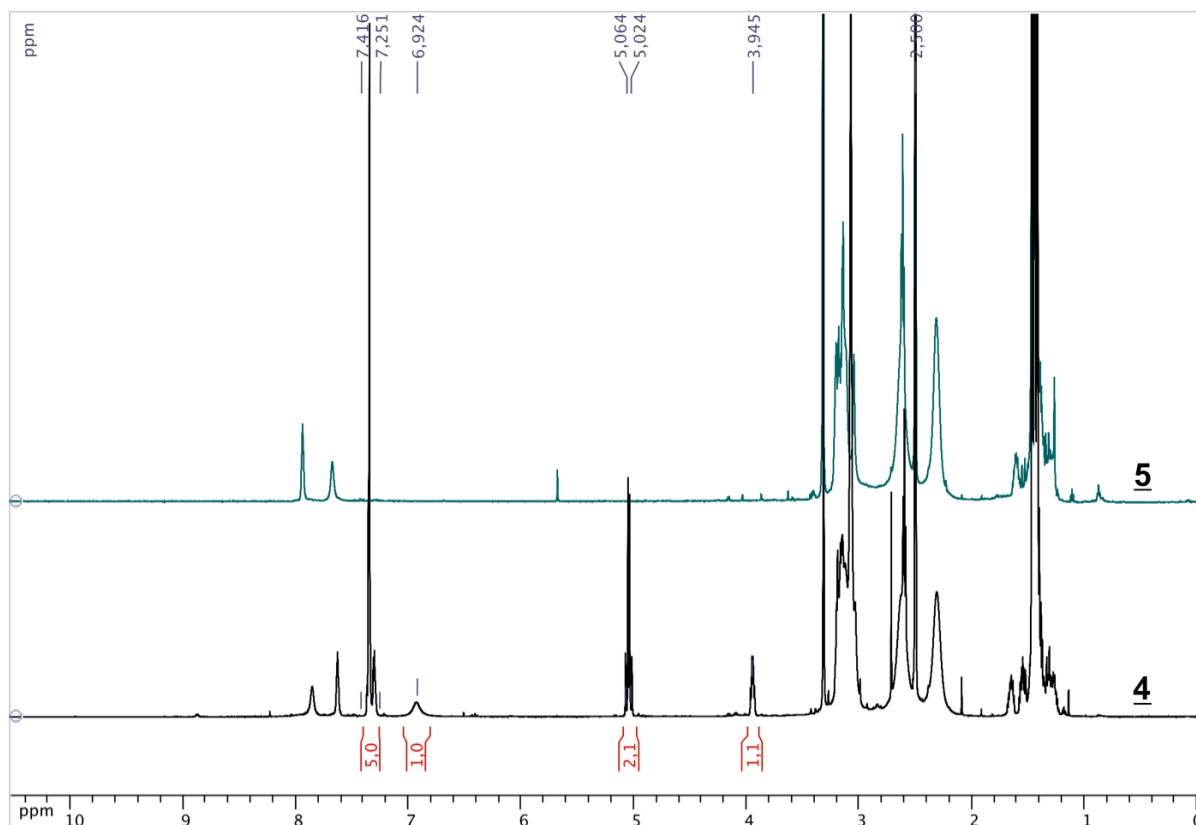


Figure II-8 : Spectres RMN ^1H (DMSO, 600 MHz, 353 K) des composés **4** et **5**.

L'attaque nucléophile de la fonction amine primaire du composé **5** sur la fonction isothiocyanate du FITC permet la formation du composé **6** *via* la formation d'une fonction thiourée (Schéma II-6).

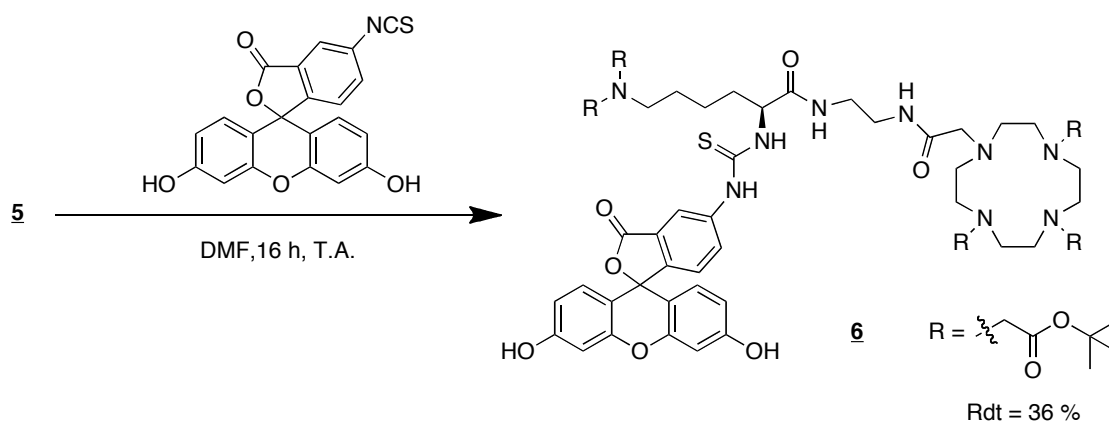


Schéma II-6

L'avant dernière étape de synthèse consiste à déprotéger les fonctions acétate du composé **6** par hydrolyse des esters tert-butyliques à l'aide de l'acide trifluoroacétique. Malheureusement, le produit de la réaction n'a pu être isolé ni même observé par spectrométrie de masse. Après une étude bibliographique approfondie, il apparaît que les conditions acides de la déprotection

provoquent une dégradation du composé pouvant être assimilée à une dégradation d'Edman (Schéma II-7).²⁰⁶

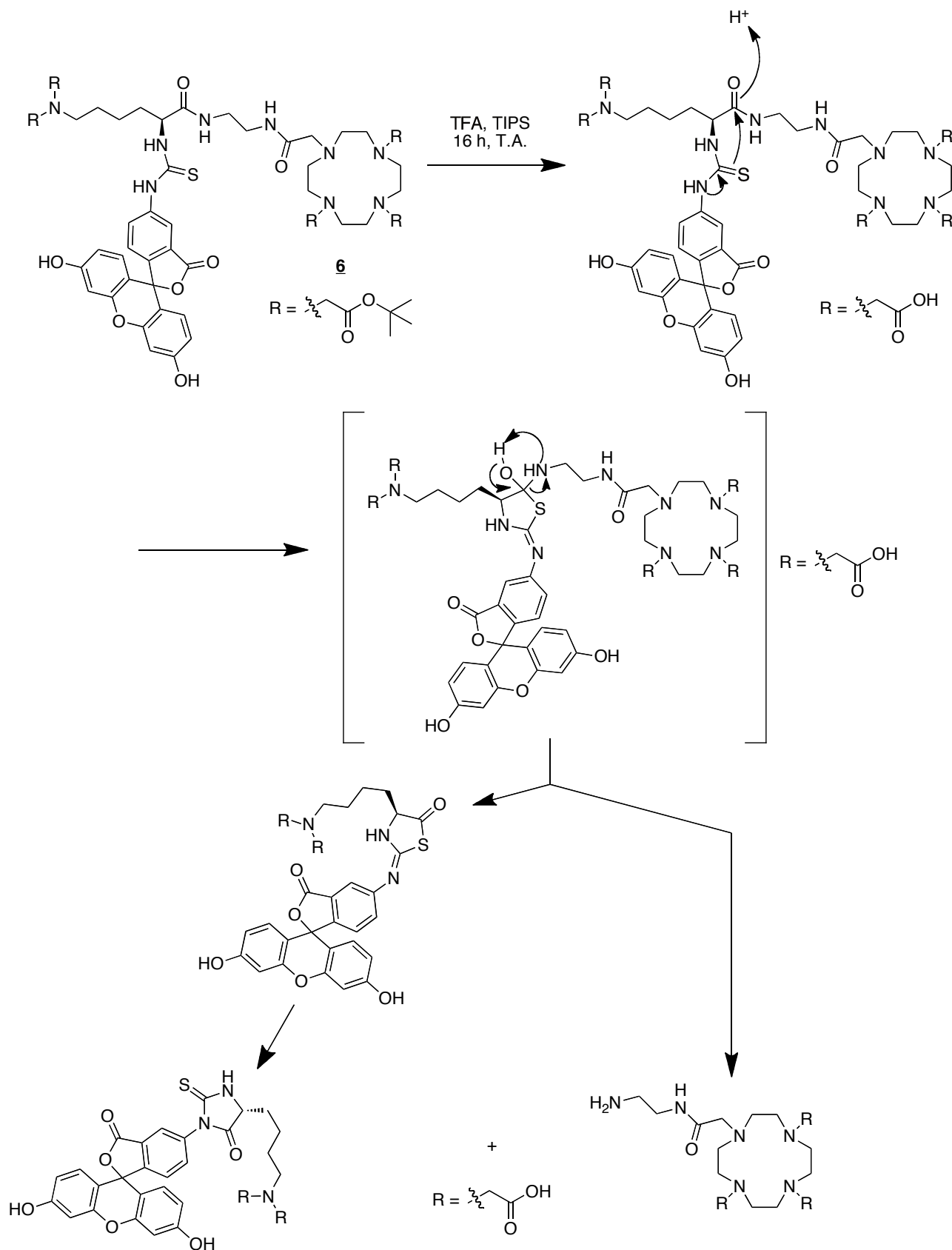


Schéma II-7

Ce mécanisme a pu être confirmé par une analyse approfondie du spectre de masse électrospray (ionisation négative) du composé brut (Figure II-9). En effet, au moins un des deux sous-produits de la dégradation a pu être observé.

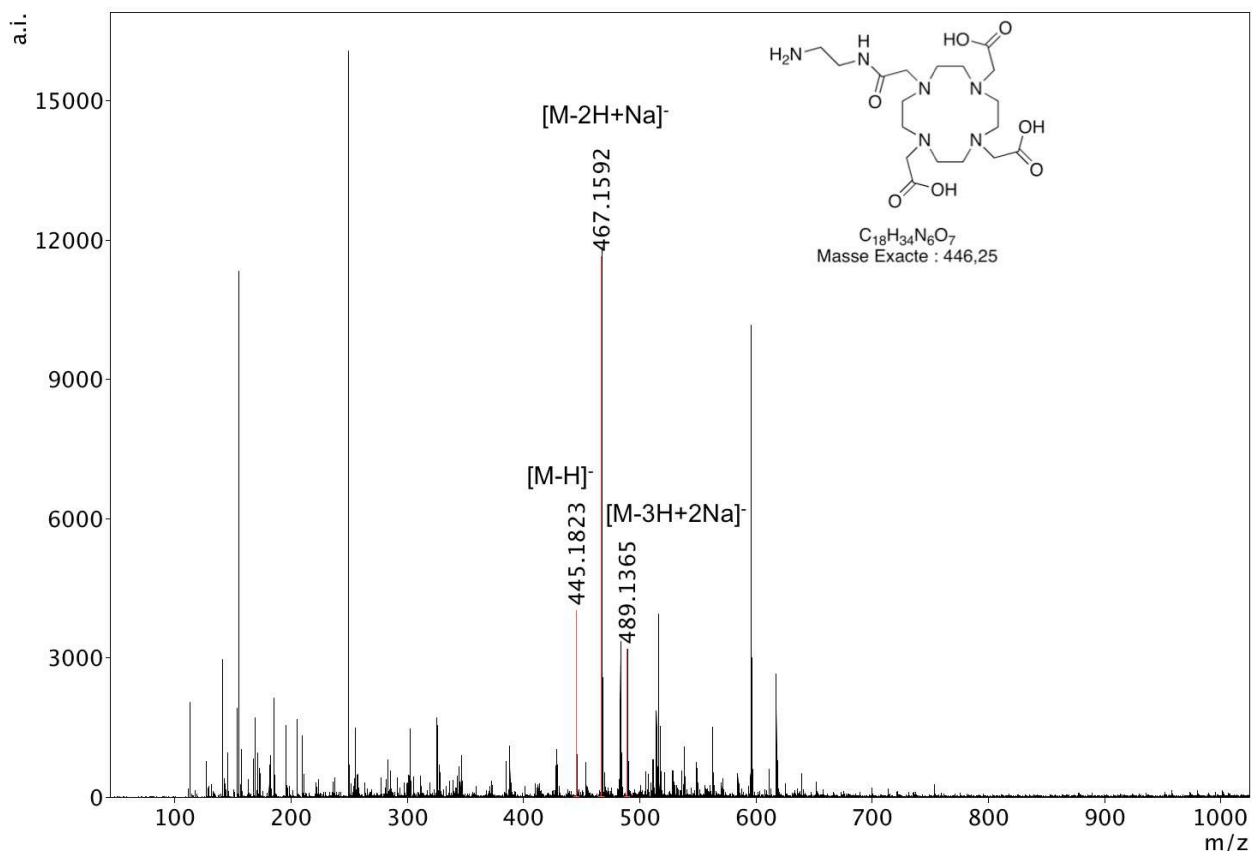


Figure II-9 : Spectre de masse Electrospray après déprotection du composé **6**.

Cette réaction de dégradation n'intervient que dans le cas de fonctions thiourées situées en position α d'un acide aminé. Afin de contourner ce problème le fluorophore peut être positionné en position ϵ de l'acide aminé, mais cette opération nécessiterait de nombreuses modifications du schéma de synthèse. Une seconde solution consiste à utiliser une autre fonction sur le fluorophore capable de réagir avec une amine primaire.

L'ouverture de l'anhydride succinique sur la 5-aminofluorescéine permet d'accéder au composé **7** avec un rendement de 81 % (Schéma II-8). L'introduction de ce nouveau dérivé de la fluorescéine sur le motif lysine peut ensuite être réalisée par couplage peptidique entre la fonction acide carboxylique du composé **7** et l'amine primaire du composé **5**. Après traitement de la réaction, le composé **8** est obtenu avec un rendement de 69 %.

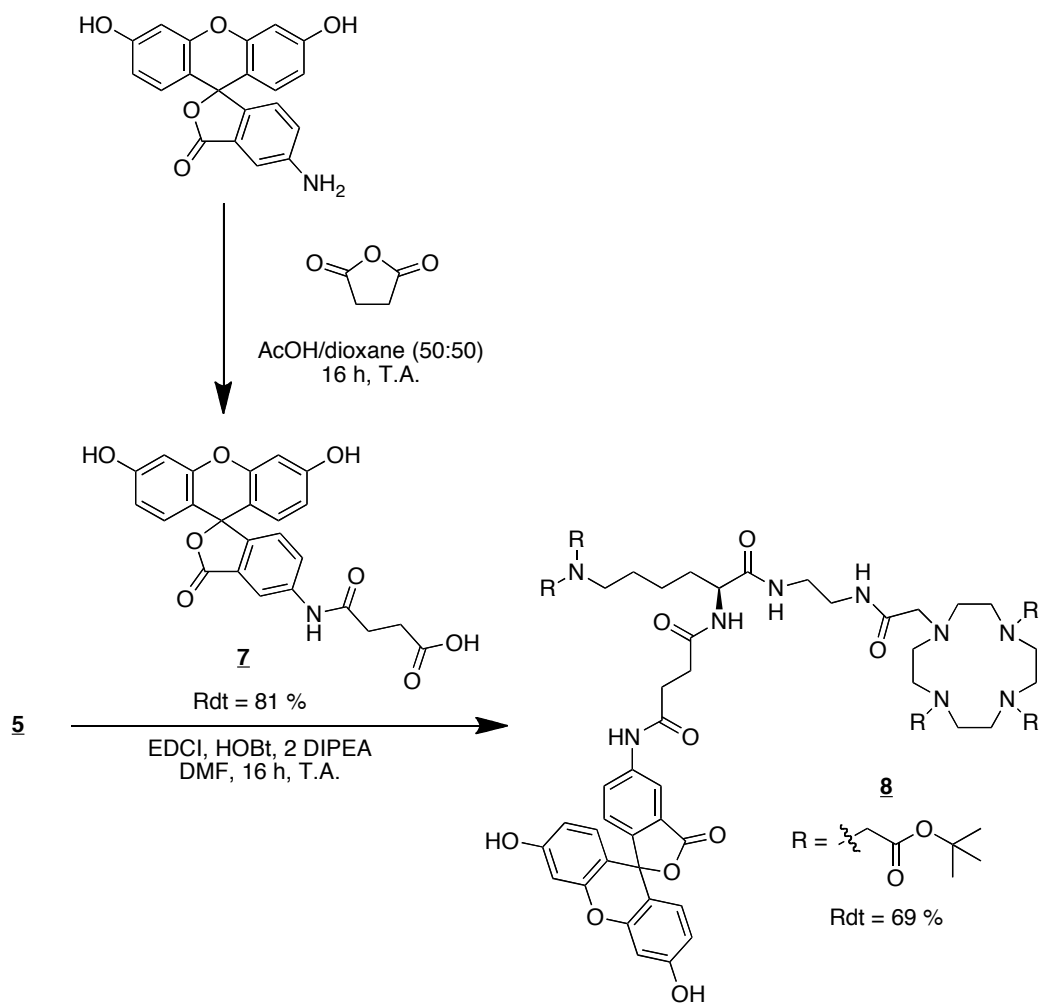


Schéma II-8

La formation du composé **8** a pu être prouvée par analyse des spectres de RMN ^1H , ^{13}C , COSY et HMQC, ainsi que par spectrométrie de masse électrospray (Figure II-10).

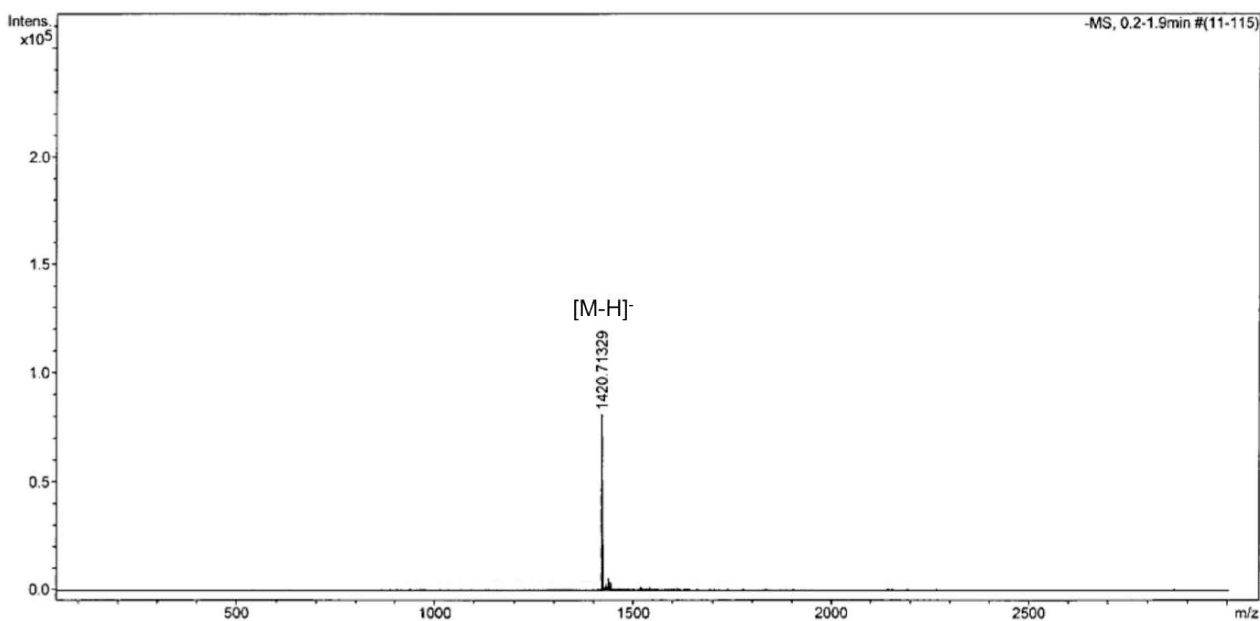
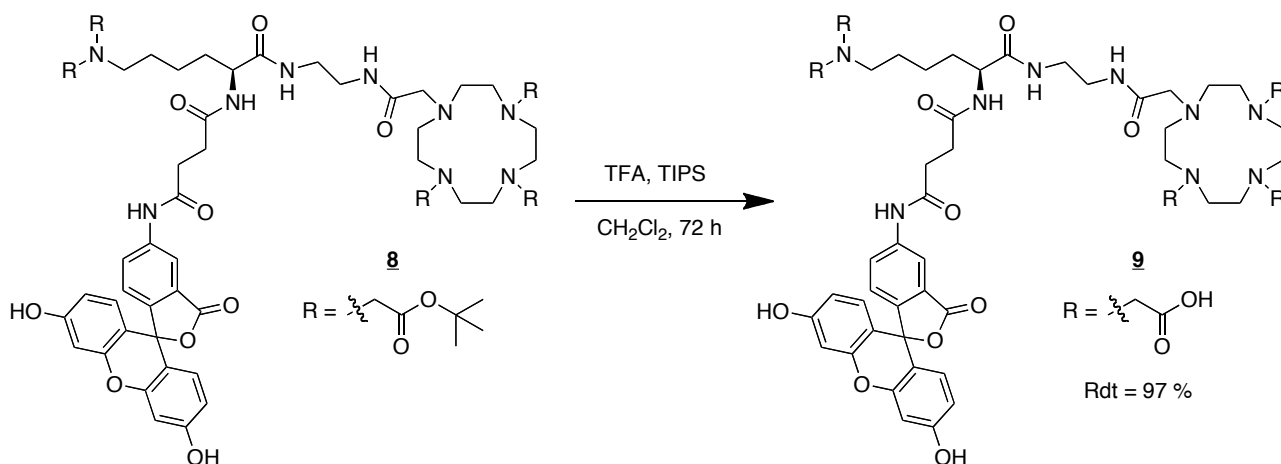
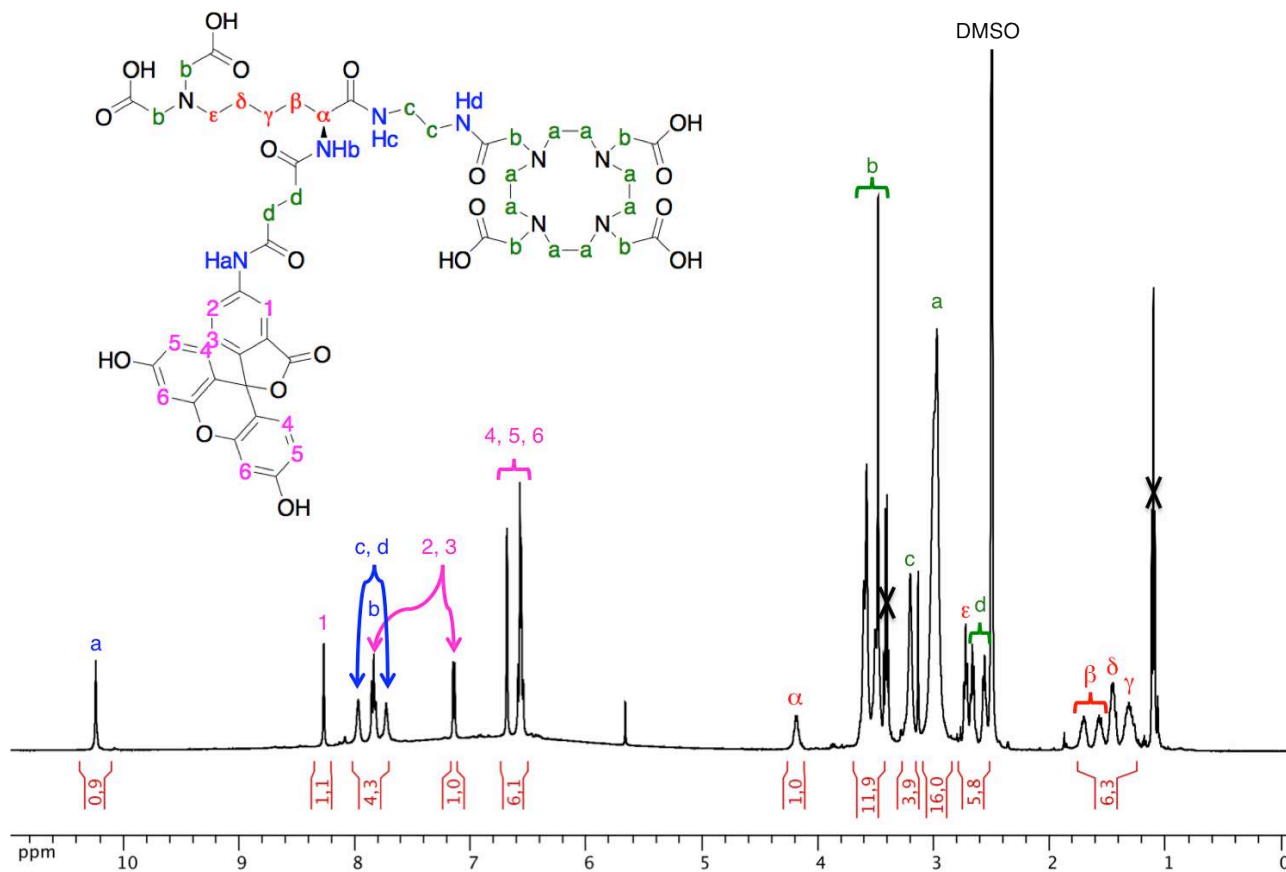


Figure II-10 : Spectre de masse Electrospray du composé **8**.

Le composé **8** est placé dans l'acide trifluoroacétique en présence de triisopropylsilane pendant 72 heures afin de libérer les cinq fonctions acide carboxylique, permettant d'isoler le composé **9** avec un rendement de 97 % (Schéma II-9).



Le spectre de RMN ^1H du composé **9** a été enregistré à 363 K dans le DMSO, à une fréquence de 500 MHz. En s'appuyant le spectre RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ et les cartes de corrélation COSY $\{^1\text{H}-^1\text{H}\}$ et HMQC $\{^{13}\text{C}-^1\text{H}\}$, l'ensemble des signaux du spectre de RMN ^1H a pu être attribué (Figure II-11).



La formation de l'espèce activée sous la forme d'anhydride cyclique pourra finalement être réalisée grâce à la prédisposition des deux fonctions acétate en position 1 à former un cycle à six chaînons. Cependant, il nous faudra envisager l'utilisation d'un autre agent de cyclisation que le mélange pyridine/anhydride acétique utilisé pour la synthèse des composés **1** et **2**. En effet, ces conditions de synthèse mènent inévitablement à la formation de la fluorescéine diacétate,^{207,208} dérivé de la fluorescéine non fluorescent. L'utilisation du dicyclohexylcarbodiimide (DCC) en tant qu'agent de déshydratation a été rapportée dans la littérature²⁰⁹ et devrait donc nous permettre d'accéder au produit final (Schéma II-10). Ces travaux sont actuellement en cours au laboratoire.

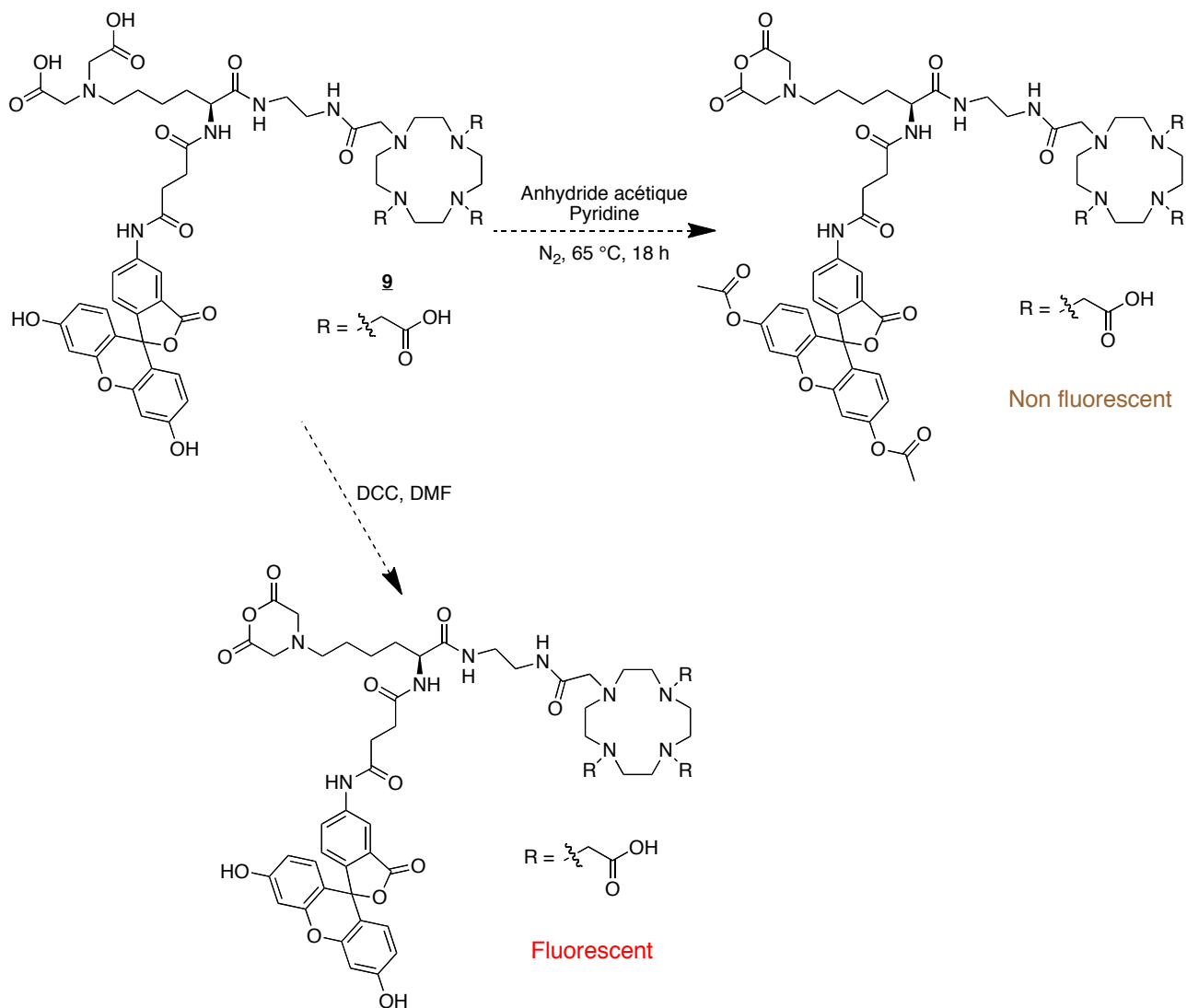
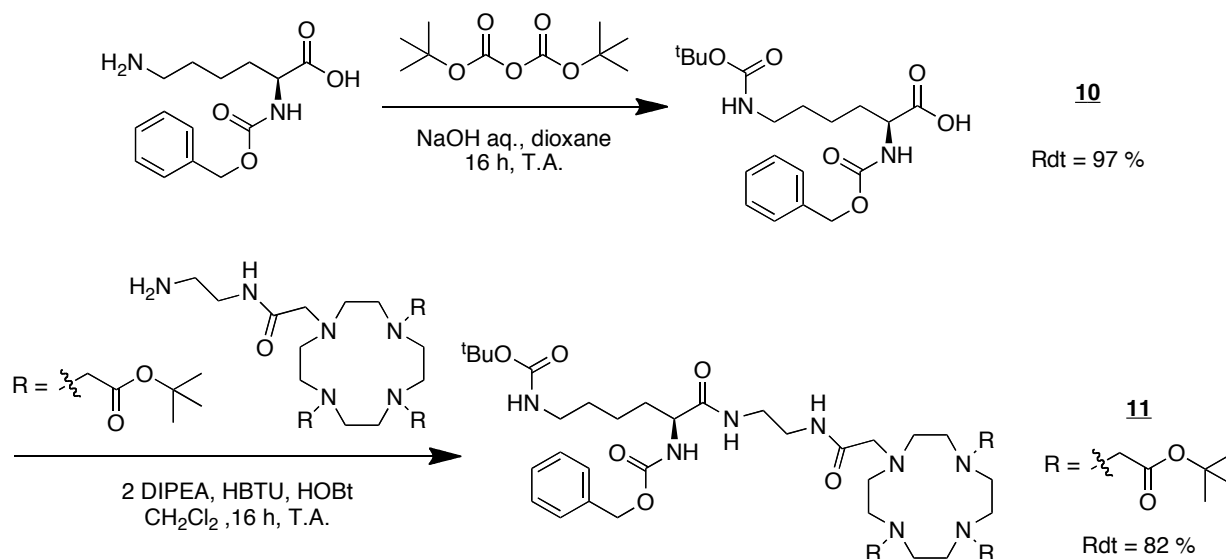


Schéma II-10

II.3.2 Introduction d'autres fonctions de greffage

Dans l'optique d'étendre notre gamme de cibles biologiques, nous avons également envisagé l'introduction d'autres fonctions de greffage, telles que la fonction isothiocyanate ou la fonction maléimide.

La protection de l'amine primaire libre de la L-Lys(Z)-OH par un groupement Boc a tout d'abord été réalisée par action du dicarbonate de di-tert-butyle (Boc_2O) en milieu basique dans un mélange eau/dioxane.²¹⁰ Suivant le protocole utilisé pour la synthèse du composé **4**, l'agent chélatant est ensuite introduit par couplage peptidique entre la fonction acide carboxylique du composé **10** et la fonction amine primaire du DO3A^tBu-N-(2-aminoéthyl)éthanamide pour former le composé **11** avec un bon rendement (Schéma II-11).



La formation du composé **11** a été mise en évidence par analyse des différents spectres de RMN enregistrés à 363 K dans le $\text{DMSO-}d_6$ à une fréquence de 500 MHz. La carte de corrélation COSY nous permet notamment de mettre en évidence le couplage des différents protons amidiques avec les groupements CH ou CH_2 adjacents (Figure II-12).

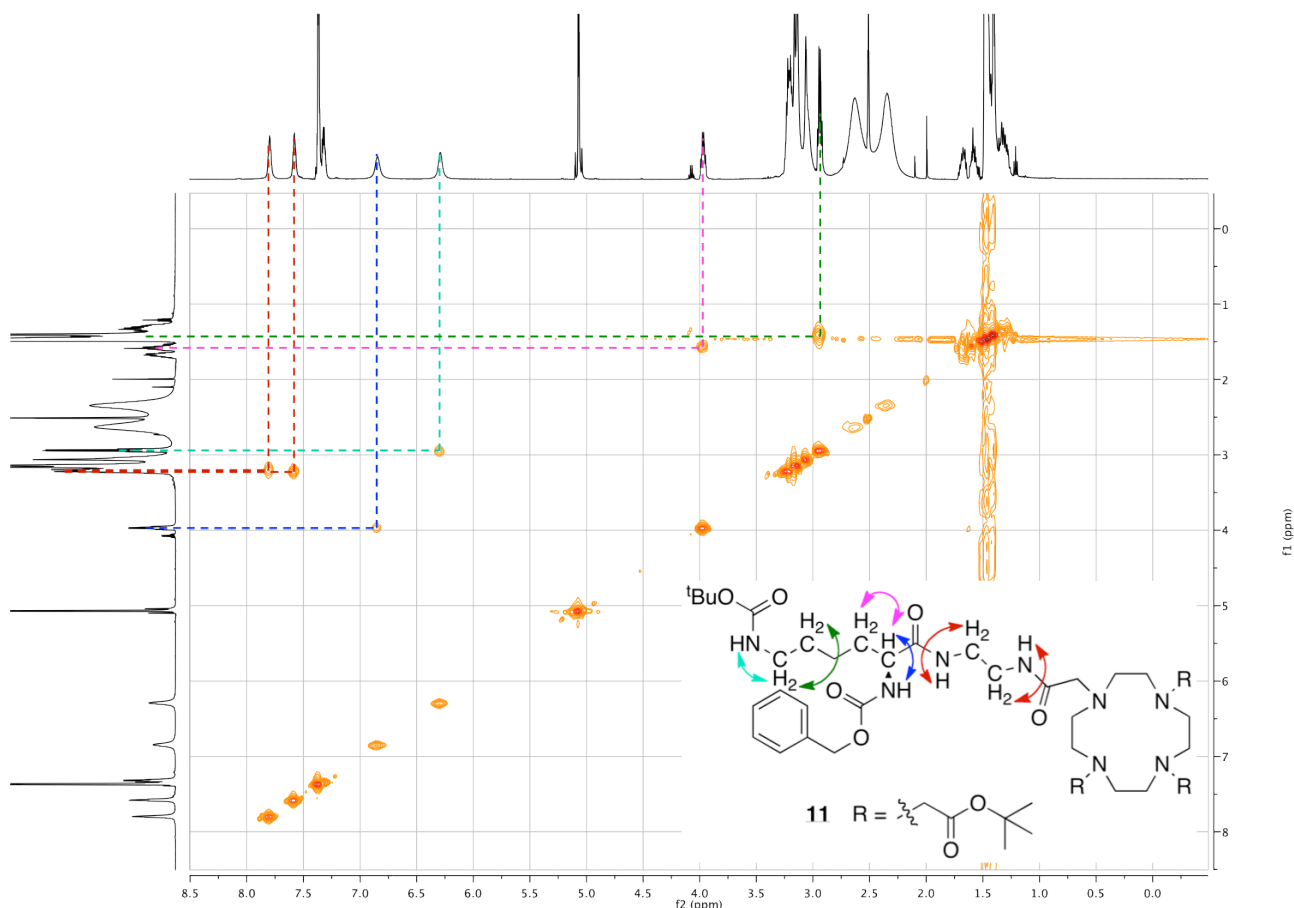


Figure II-12 : Carte de corrélation COSY $\{^1\text{H}-^1\text{H}\}$ du composé **11** (DMSO, 500 MHz, 363 K).

La déprotection de la fonction amine primaire par hydrogénolyse paladocatalysée permet d'accéder au composé **12**. Ce dernier, pourra par la suite être couplé au composé **7** par couplage peptidique et devrait permettre l'obtention du composé DOTA-fluorescéine protégé (Schéma II-12).

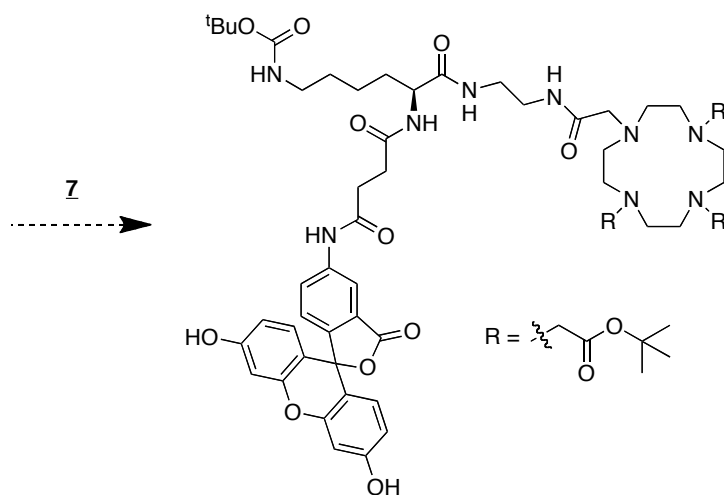
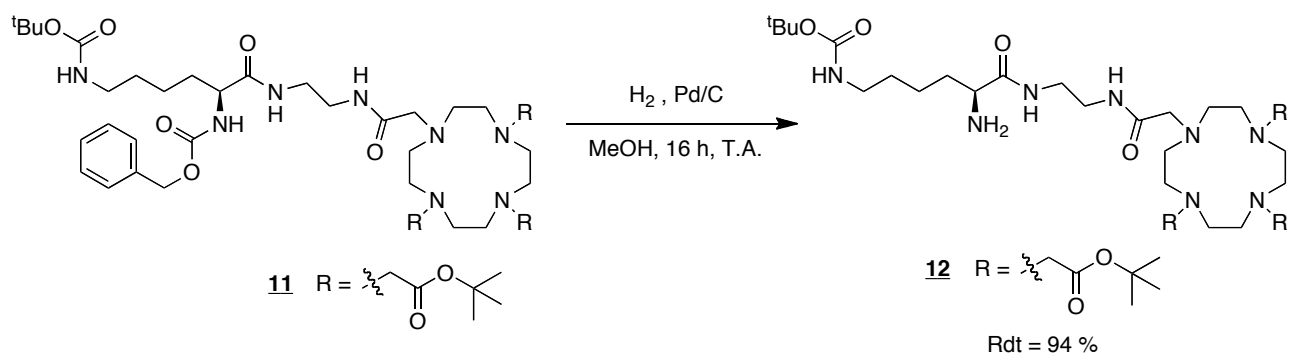


Schéma II-12

La déprotection de la fonction amine primaire ainsi que des groupements acide carboxylique permettra alors l'insertion des différentes fonctions de greffage désirées *via* la fonction amine primaire disponible (Schéma II-13). Ainsi, l'insertion d'une fonction isothiocyanate peut être réalisée par le couplage d'un dérivé intermédiaire nitro, tandis que l'utilisation d'un ester activé porteur d'un groupement maléimide permettrait de cibler les résidus cystéines.

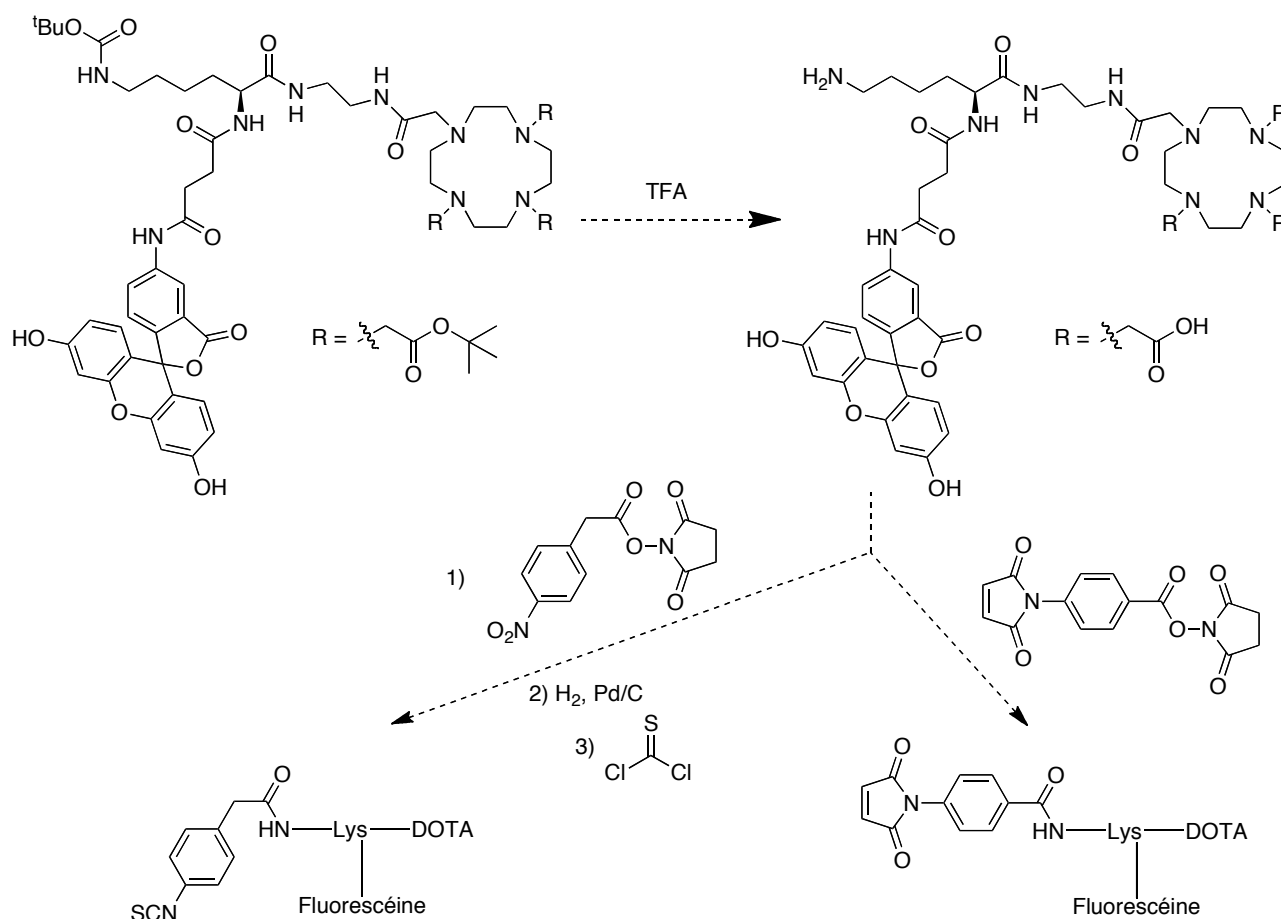


Schéma II-13

Ces différents composés, actuellement en cours de développement au laboratoire, permettront d'accéder à de nouveaux immunoconjugués porteurs d'un fluorophore et d'un marqueur radioactif pour l'imagerie *in vitro* et *in vivo*.

II.4 Conclusion

Nous avons présenté dans ce chapitre la synthèse d'un agent chélatant macrocyclique bifonctionnel porteur d'une fonction de greffage anhydride cyclique. Ce polyazacycloalcane a d'ores et déjà été intégré à des nanoparticules d'oxyde de gadolinium,²¹¹ et son utilisation en immunoscintigraphie sera décrite dans le chapitre III. Nous avons par la suite envisagé l'introduction de cette fonction anhydride cyclique sur un système multimodal DOTA-fluorescéine. Enfin, la synthèse de dérivés de ce système DOTA-fluorescéine porteurs d'autres fonctions de greffage est en cours au laboratoire.

Parallèlement à ces travaux, d'autres agents bimodaux ont été synthétisés au laboratoire dans le cadre de la thèse de Claire Bernhard, notamment un système intégrant une partie macrocyclique ainsi qu'un fluorophore de type BODIPY[®].^{84,99} Les dipyrrométhènes de bore, plus connus sous la dénomination "Bodipy", sont des fluorophores qui présentent de bonnes propriétés de fluorescence

tout en possédant une stabilité accrue à l'égard de phénomènes de dégradation tels que le photoblanchiment.

Cet agent bimodal a été construit selon le même raisonnement précédemment utilisé. Un amino acide modifié a été utilisé comme plateforme afin d'introduire un motif macrocyclique et un synthon Bodipy en plus d'une fonction de greffage. La Figure II-13 présente la structure de cet agent bimodal que nous appellerons DOTA-Bodipy-NCS.

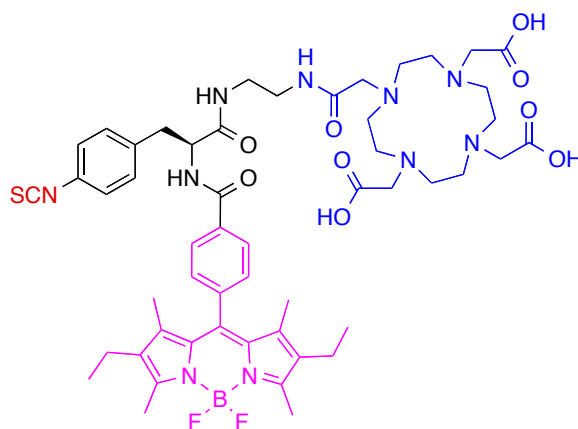


Figure II-13 : Structure du DOTA-Bodipy-NCS.

Le greffage de ce composé sera également décrit dans le chapitre III.

Chapitre III :

Greffage et marquage de molécules biologiques pour l'imagerie ciblée

III. Greffage et marquage de molécules biologiques pour l'imagerie ciblée

III.1 Marquage du trastuzumab et du cétuximab : nouveaux traceurs pour l'imagerie vectorisée en oncologie

Avec le développement de la médecine “personnalisée”, les anticorps monoclonaux redeviennent des outils incontournables pour le développement de l'imagerie moléculaire. Afin d'évaluer un nouvel agent chélatant pour l'imagerie TEMP, il est nécessaire de sélectionner un vecteur biologique adapté dont les caractéristiques pharmacodynamiques ont déjà été éprouvées. Cependant, le traceur doit également susciter un intérêt pour la communauté scientifique. La section suivante porte donc sur le marquage de deux anticorps monoclonaux qui font actuellement l'objet de nombreuses études en oncologie et qui s'inscrivent parfaitement dans le contexte du projet Pharm'Image®. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec la société Oncodesign, spécialisée dans l'évaluation pré-clinique de thérapies anti-cancéreuses.

III.1.1 Mise au point des conditions expérimentales

Le greffage de petites molécules organiques sur des biomolécules nécessite de nombreuses optimisations, tant au niveau de la réaction de greffage proprement dite que pour les techniques d'analyse du produit final. Il convient donc de décrire les différents éléments à considérer pour réaliser et caractériser une réaction de bioconjugaison.

III.1.1.1 Méthode de greffage

Notons tout d'abord que toutes les biomolécules faisant l'objet d'études dans ce travail de thèse sont utilisées en clinique. Il est donc nécessaire d'éliminer les différents excipients entrant dans la formulation du médicament afin d'éviter la formation de produits secondaires. Chaque protéine a par conséquent été purifiée par filtration centrifuge avant tout autre traitement.

Tous les greffages réalisés dans les sections suivantes ont été réalisés en milieu aqueux tamponné. Dans la majorité des cas, la solution tampon utilisée est un tampon phosphate salin (PBS) 0,1 M à pH = 7,4, et les réactions de bioconjugaison sont réalisées à 25 °C.

La majorité des réactions ont été réalisées sur le modèle décrit par De Vries et coll.⁹⁶ Les différentes molécules à greffer sont mises en suspension dans le chloroforme à des concentrations définies, et la quantité désirée de suspension est ensuite placée dans un microtube en polypropylène.

Après évaporation du chloroforme, la solution de protéine est additionnée dans des quantités prédéfinies, et le milieu réactionnel est agité sur agitateur orbital (vortex). La filtration centrifuge s'est révélée une méthode simple et rapide de purification des produits par rapport à la dialyse. Notre choix s'est porté sur des microfiltres centrifuges Nanosep® (Pall Corporation) avec différents seuils de coupure suivant le poids moléculaire de la protéine à purifier. Tous les produits finaux ont été conservés en solution dans le PBS à 4 °C.

III.1.1.2 Analyse des échantillons

Une analyse quantitative et qualitative des échantillons est un prérequis indispensable à la réalisation d'expérimentations *in vitro* et *in vivo*. Les deux principales informations nécessaires sont d'une part la concentration en protéine de la solution utilisée, et d'autre part le taux de greffage de l'immunoconjugué.

III.1.1.2.1 Détermination de la concentration de la solution

La concentration en protéine d'une solution est généralement exprimée en $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ et peut être déterminée de différentes manières. La majorité des méthodes de détermination de la concentration en protéine sont des méthodes colorimétriques (méthodes de Bradford, de Lowry, etc.) et nécessitent la réalisation de courbes d'étalonnage par spectrophotométrie UV-visible à l'aide d'une solution de protéine à une concentration connue.

Il est également possible de déterminer la concentration de la solution par spectrophotométrie UV-visible. L'absorbance maximale se situe à 280 nm, et si l'on dispose du coefficient d'extinction molaire de la protéine, il est alors aisé de déterminer la concentration en protéine de la solution par lecture de l'absorbance à 280 nm. Étant en possession de ces valeurs pour chacune des protéines étudiées, nous avons choisi cette technique de détermination de la concentration pour toutes les expériences décrites. La concentration de chaque solution a donc été déterminée avant et après greffage, en considérant l'absorbance à 280 nm du fragment macrocyclique comme négligeable.

III.1.1.2.2 Détermination du taux de greffage

Nous avons choisi d'utiliser la spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight) comme outil de détermination du taux de greffage. Cette méthode est en effet l'une des plus simple à mettre en œuvre, et présente l'avantage de ne nécessiter qu'une très faible quantité de produit. Elle nécessite néanmoins de nombreuses optimisations, tant au niveau des réglages de l'appareil que lors de la préparation de l'échantillon.

La source MALDI repose sur le bombardement à l'aide d'un laser d'une substance dispersée dans une matrice solide. Cette matrice possède un fort pouvoir d'absorption du rayonnement, et transfère l'énergie vers l'analyte afin de l'ioniser. Le choix de la matrice et la préparation du dépôt sont deux éléments déterminants pour obtenir une bonne ionisation de l'analyte. Après de nombreux tests de matrices (Figure III-1), et en se référant à la littérature,^{212,213} l'acide sinapinique (SA) s'est révélé la matrice permettant d'obtenir la meilleure détection et la meilleure résolution.

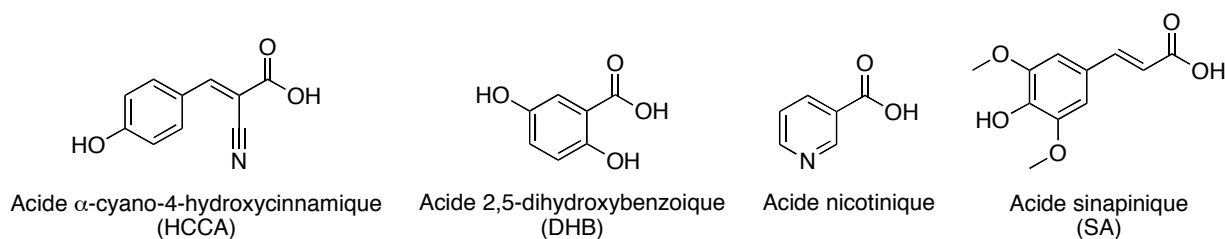


Figure III-1 : Représentation des différentes matrices testées pour l'analyse de protéines.

Il est à noter que la détermination du taux de greffage ne peut se faire que si la protéine de référence a subi les mêmes opérations (changement de tampon, ajout d'un solvant organique...) que l'échantillon à analyser. En effet, nous avons pu constater qu'un changement de tampon, ou la présence d'un solvant organique tel que le DMSO lors de l'analyse d'un même composé conduit à une variation de m/z pouvant aller jusqu'à 2000 unités de masse. Il est donc essentiel de pouvoir garantir que la différence de masse observée est uniquement due au greffage de l'agent chélatant. Le taux de greffage est alors obtenu par simple différence entre la masse de l'immunoconjugué et celle de la protéine "native".

III.1.1.3 Radiomarquage

III.1.1.3.1 Conditions opératoires

La manipulation de radionucléides nécessite la mise en œuvre de conditions opératoires particulières. Toutes les expériences de radiométagation ont été réalisées derrière un écran plombé ou dans une cellule blindée suivant les activités manipulées. Comme il a été évoqué précédemment, nous avons choisi de réaliser les radiomarquages avec l'indium-111 afin de pouvoir réaliser par la suite des études de biodistribution *in vivo* du radiotraceur par TEMP.

L'indium-111 ($t_{1/2} = 67,3$ h) est disponible commercialement sous forme de chlorure d'indium-111 solubilisé dans une solution d'acide chlorhydrique (HCl 0,05 N). Notons que la préparation de radioimmunconjugués ne nécessite que de faibles activités, et le radionucléide est donc présent à l'état de trace. À titre d'exemple, une activité de 37 MBq d'indium-111 correspond à une quantité

de 21,3 pmol. Dans ce contexte, il est primordial d'éviter toute contamination métallique qui pourrait réduire de façon drastique le rendement de radiomarquage. Afin de minimiser ce risque, toute la verrerie et tous les consommables plastique (pointes de micropipette, microtubes, etc.) ont été traités à l'acide chlorhydrique 3 N puis rincés abondamment à l'eau ultra pure 18,2 M Ω avant d'être séchés à l'étuve. Pour les mêmes raisons, les solutions tampons ont été préparées à partir de sels exempts d'impuretés métalliques (*Trace Select*[®]) et d'eau ultra pure 18,2 M Ω .

Le fait de travailler avec des traces d'indium-111 implique d'utiliser un excès d'agents chélatants par rapport au radionucléide. En effet, suivant l'application visée (tests *in vitro*, imagerie *in vivo*), il n'est pas utile d'engager plus de radioactivité que nécessaire, tant pour des raisons évidentes de radioprotection que pour des raisons de coût.

III.1.1.3.2 Contrôle qualité

Le contrôle de la pureté radiochimique est réalisé par radio-ITLC (*Instant Thin Layer Chromatography*) grâce à un radiochromatographe γ . La phase stationnaire de chromatographie consiste en un papier de microfibrilles de verre imprégné de gel de silice. L'utilisation d'une solution de citrate de sodium à pH = 5 comme éluant permet de séparer l'indium-111 libre ou complexé à un agent chélatant (DOTA, DTPA, EDTA) d'un anticorps radiomarqué. Dans ce système, le radioimmunoconjugué reste au point de dépôt tandis que le radionucléide libre migre en front de solvant. Le radiochromatographe permet ensuite de localiser la radioactivité sur toute la bande chromatographique. Le chromatogramme obtenu permet ensuite de déterminer le rendement de radiomarquage et la pureté radiochimique (PRC) par intégration des différents pics présents (Figure III-2).

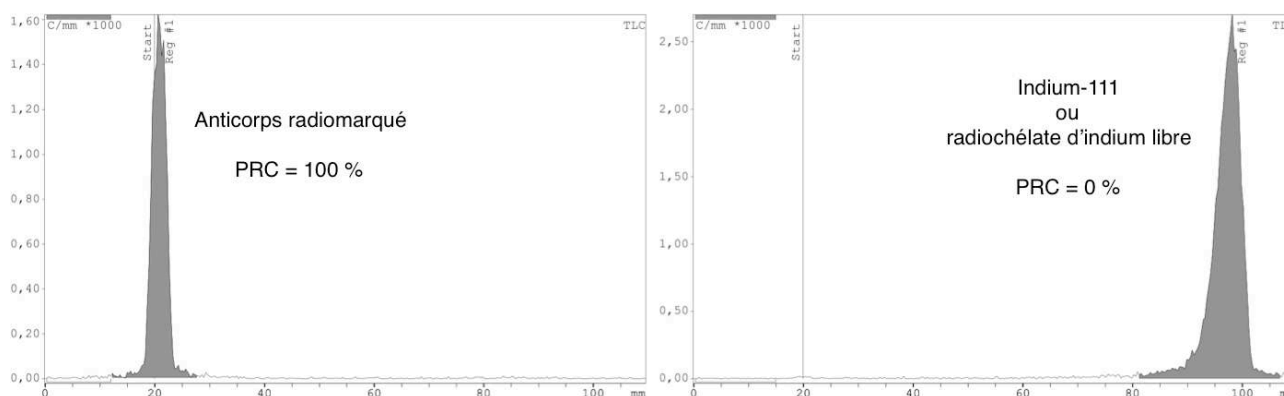


Figure III-2 : Radiochromatogrammes ITLC d'un anticorps radiomarqué (gauche) et de l'indium-111 libre (droite).

III.1.2 Marquage du trastuzumab

III.1.2.1 Le trastuzumab : état de l'art

Le trastuzumab (Herceptin[®], Roche) est un anticorps monoclonal humanisé de la famille des IgG qui se lie sélectivement au récepteur HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2) également appelé HER2/*neu*, ErbB2 ou encore c-erbB2. HER2 est une protéine transmembranaire impliquée dans la croissance, la survie et la multiplication des cellules, et est surexprimée dans de nombreux types de cancers (sein, ovaires, glandes salivaires, estomac, reins, colon, prostate, urinaire, et cancer bronchique non à petites cellules). Ainsi, 25-30 % des cancers du sein surexpriment HER2.^{214,215} La surexpression de ce récepteur favorise l'augmentation de la prolifération, de la motilité, et du taux de survie des cellules cancéreuses, et est généralement associée à une résistance de la maladie vis-à-vis des traitements anticancéreux conduisant à un mauvais pronostic de survie à long terme. Par conséquent, HER2 est apparu comme une cible de choix pour la thérapie du cancer du sein, menant au développement de nouveaux anticorps, dont le trastuzumab.

Par sa liaison au domaine extracellulaire du récepteur HER2, le trastuzumab inhibe les processus de croissance cellulaire, et permet également la destruction de la cellule par le système immunitaire.²¹⁶ Les traitements anticancéreux à l'Herceptine permettent donc principalement de ralentir voire d'arrêter le développement de la tumeur. Cet anticorps est donc utilisé en association avec des anticancéreux qui auront pour rôle de détruire les cellules cancéreuses.

L'efficacité du trastuzumab dépend du degré d'expression de HER2 dans la tumeur primaire, et il est donc nécessaire de déterminer un "statut HER2" afin de décider si un traitement à l'Herceptine est nécessaire. La détermination du statut HER2 est aujourd'hui réalisée à l'aide de techniques d'immunohistochimie (IHC), d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)²¹⁷ ou chromogénique (CISH)²¹⁸. Ces outils indispensables pour la sélection des patients souffrent cependant d'une mise en œuvre délicate en milieu clinique pouvant mener à un taux d'erreur supérieur à 20 %.²¹⁹⁻²²¹ De plus, le caractère invasif des prélèvements limite leur répétition et la quantité d'échantillon. Le succès d'une thérapie ciblée sur HER2 est donc fortement dépendant d'une caractérisation fine de l'expression de HER2. Afin de sélectionner les patients éligibles à un traitement par le trastuzumab, il est nécessaire d'évaluer systématiquement leur statut HER2, et donc de procéder à une intervention invasive. En outre, les cancers du sein HER2-positifs sont hétérogènes, et des différences de statut HER2 peuvent apparaître entre la tumeur primaire et les métastases.^{222,223} Il est donc clair qu'une méthode plus précise et plus fiable permettant de déterminer à la fois le statut HER2 de la tumeur primaire et des métastases serait une grande avancée dans le traitement de ces pathologies.

Les nouvelles méthodes d'imagerie moléculaire peuvent alors fournir des informations complémentaires en temps réel et de façon non invasive. De tels outils trouvent une utilité non seulement pour la détermination du statut HER2 de la tumeur primaire et des métastases, mais également dans le cadre d'un suivi thérapeutique. Le trastuzumab a déjà fait l'objet de nombreux radiomarquages, tant dans une optique d'imagerie que pour une utilisation en radioimmunothérapie. On trouve dans la littérature de nombreux exemples de marquages du trastuzumab par des radiochélates d'indium-111 pour la TEMP, mais également de lutétium-177 pour la radiothérapie métabolique.^{86,96,109,182,224} Concernant la TEP, des exemples de marquages impliquant des agents chélatants ont été rapportés lors de l'utilisation de cuivre-64 ou de zirconium-89.^{86,126,225} Ces nouveaux outils ont permis de nombreuses avancées dans la compréhension du développement de ces cancers du sein, mais de nombreux points restent à éclaircir et aucune de ces études n'a permis de mettre au point une méthode non invasive du statut HER2. Le marquage du trastuzumab par des radiomarqueurs innovants reste donc un sujet d'actualité en oncologie, et il est du ressort du chimiste de développer ces nouveaux marqueurs.

III.1.2.2 *Greffage d'agents chélatants*

Comme nous l'avons expliqué dans le paragraphe III.1.1, tous les greffages décrits ont nécessité de nombreuses optimisations, et les résultats présentés ici ne font état que des produits qui ont pu être caractérisés sans équivoque.

III.1.2.2.1 Validation de la voie de greffage

Nous avons dans un premier temps réalisé le greffage du composé **1** sur le trastuzumab **13** selon les conditions décrites dans la littérature.⁹⁶ L'ouverture d'un équivalent de DTPA dianhydride sur les amines primaires conduit à la formation de l'immunoconjugué **14** (Schéma III-1).

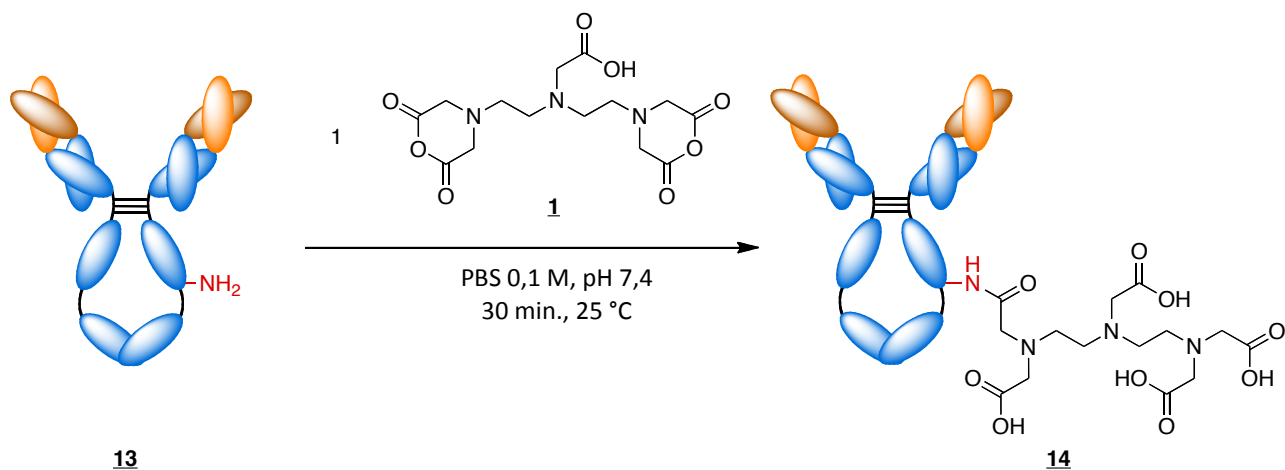


Schéma III-1

Le spectre de masse MALDI-TOF du composé **14** (Figure III-3) nous permet de déterminer un taux de greffage de 0,5 fragments de DTPA par anticorps en moyenne. Cette valeur est obtenue par calcul de la différence entre la valeur des pics moléculaire des composés **14** et **13**, et en considérant qu'un fragment DTPA a une masse molaire d'environ 376 g.mol⁻¹.

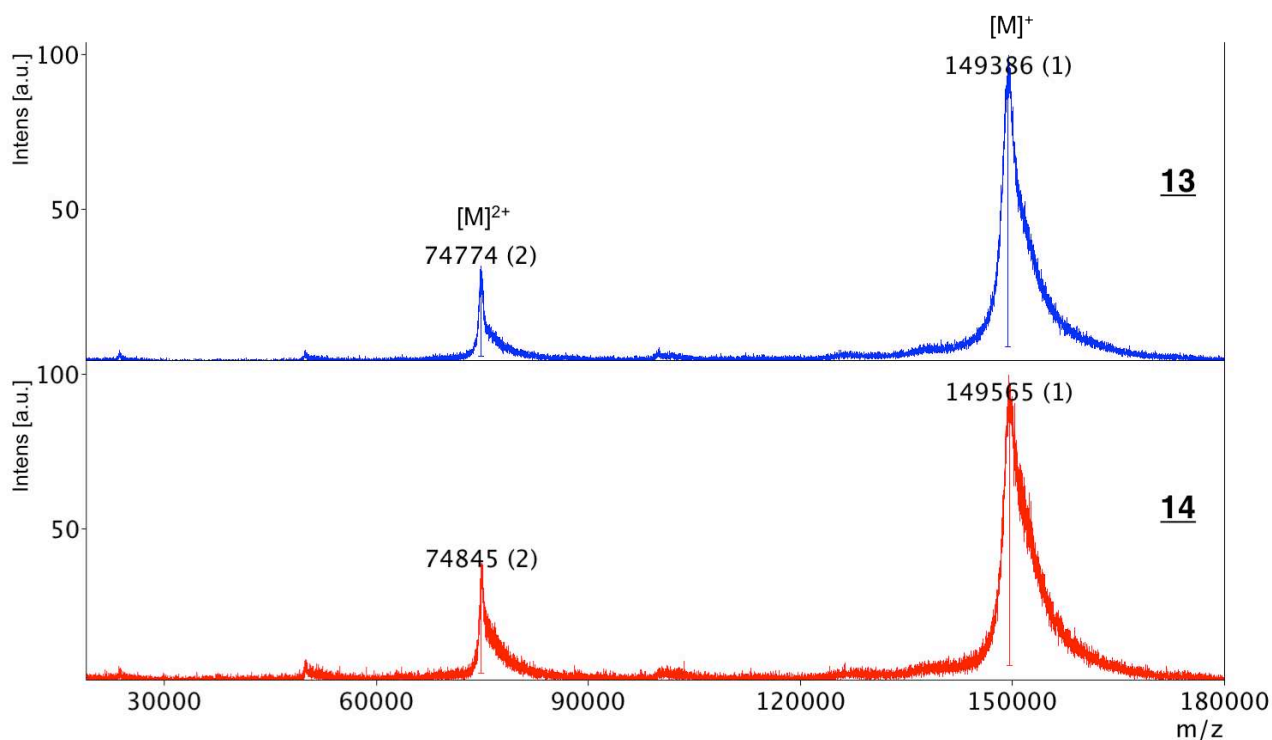


Figure III-3 : Spectres de masse MALDI-TOF des composés **13** et **14**. Les chiffres entre parenthèse indiquent la charge de l'espèce.

Ces premiers résultats en accord avec la littérature nous ont conduit à réaliser le greffage du composé **2** sur le trastuzumab.

III.1.2.2.2 Greffage du DOTAGA-anhydride

Contrairement au composé **1** qui possède deux fonctions de greffage, le composé **2** ne comporte qu'une seule fonction de greffage, ce qui évite par là même toute formation de dimère ou d'agrégat d'anticorps.

Nous avons dans un premier temps reproduit à l'identique l'expérience menée avec le composé **1** par action d'un équivalent du composé **2** sur le trastuzumab **13** (Schéma III-2).

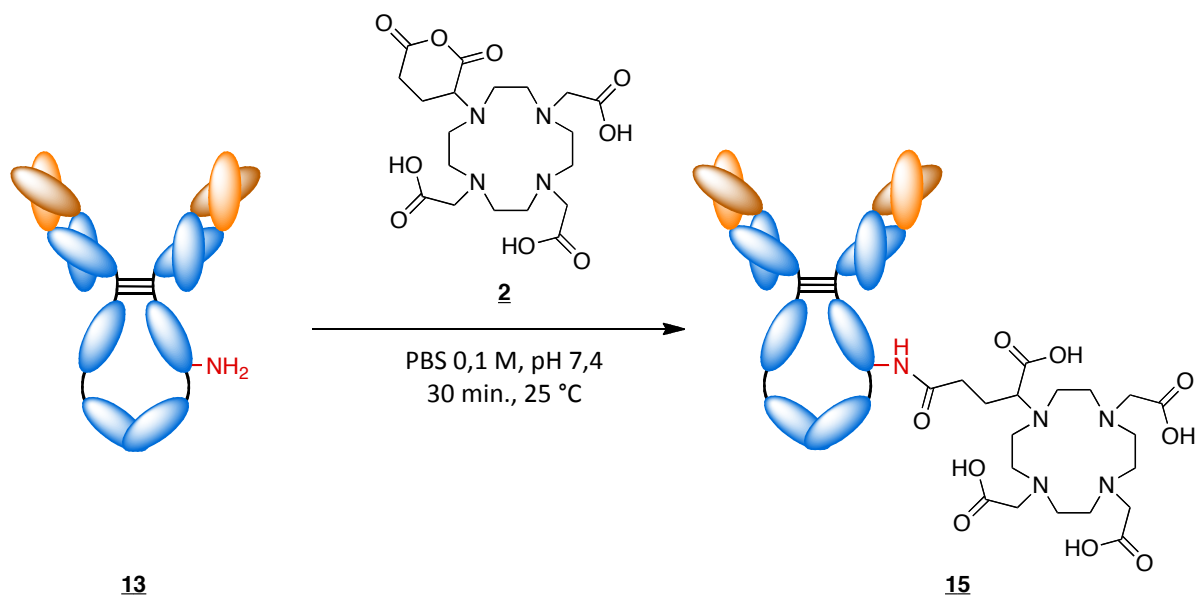


Schéma III-2

Le composé **15** ainsi obtenu a pu être caractérisé par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure III-4), permettant de déterminer un taux de greffage de 0,7 DOTAGA par anticorps en moyenne (avec $M_{\text{DOTAGA}} = 460 \text{ g.mol}^{-1}$).

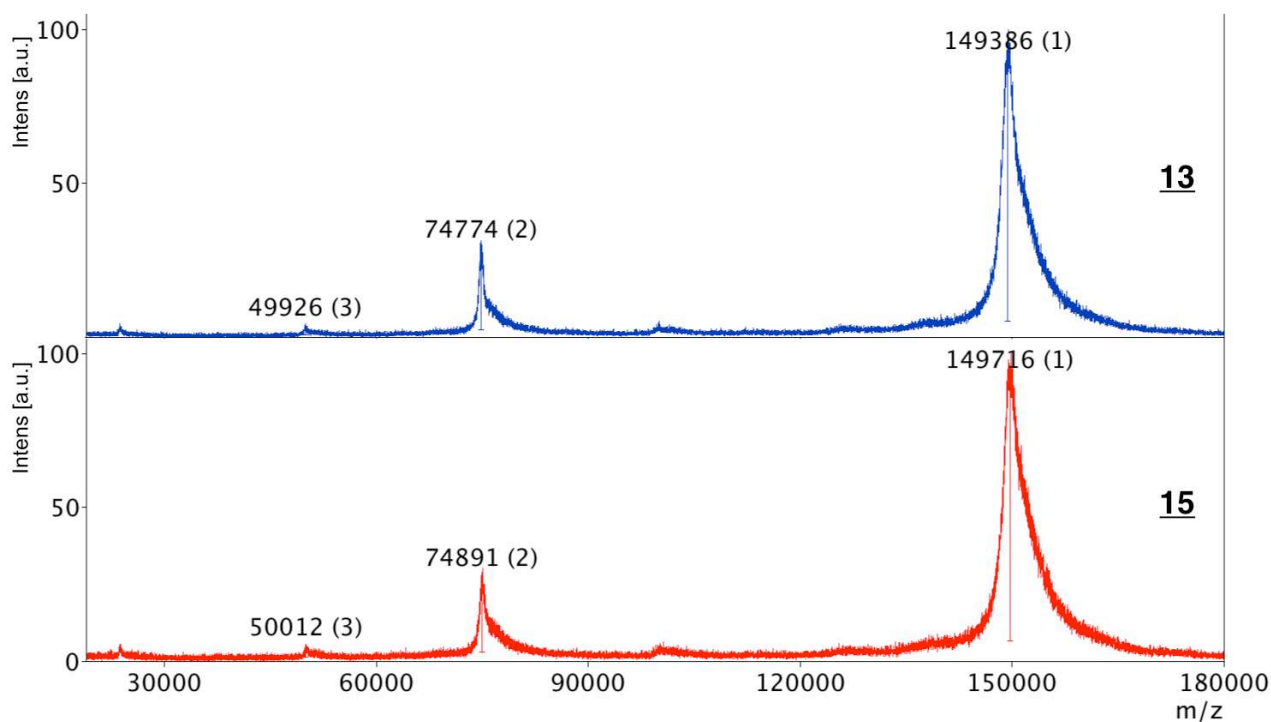


Figure III-4 : Spectres de masse MALDI-TOF des composés **13** et **15**. Les chiffres entre parenthèse indiquent la charge de l'espèce.

De nombreux autres tests de greffage ont par la suite été réalisés en faisant varier d'une part le nombre d'équivalents n du composé **2** et d'autre part la concentration en protéine de la solution [**13**]. Ces différentes réactions peuvent être résumées par le Schéma III-3.

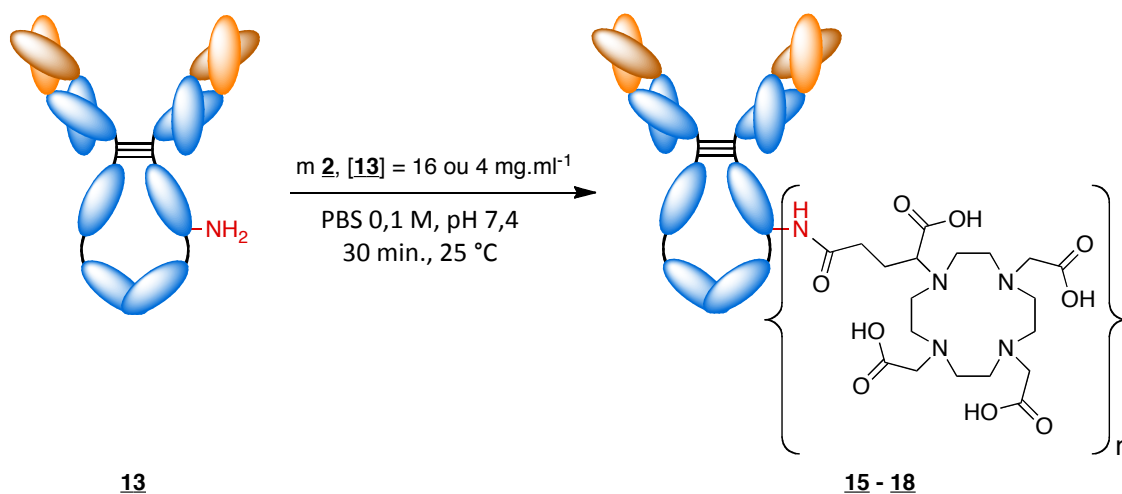


Schéma III-3

Le Tableau III-1 regroupe les principaux résultats obtenus en précisant les conditions opératoires utilisées. Les spectres de masse MALDI-TOF (140 à 170 kDa) qui nous ont permis de déterminer le taux de greffage n sont également représentés. On peut noter qu'une concentration en anticorps plus élevée permet d'obtenir des taux de greffage plus élevés pour un ratio DOTAGA/anticorps identique.

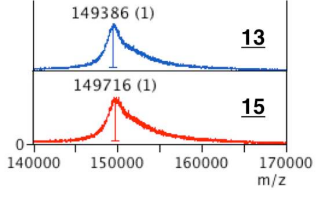
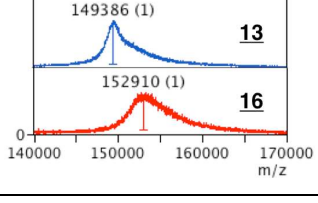
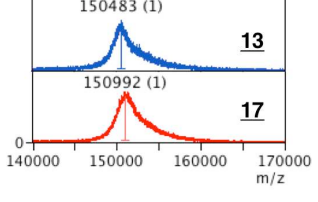
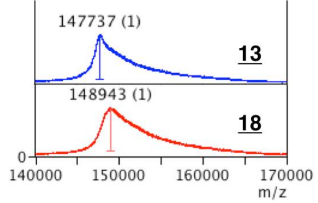
Composé	Concentration protéique (mg.mL ⁻¹)	Nombre d'équivalents m du composé <u>2</u>	Taux de greffage (n DOTAGA / trastuzumab)	Spectre de masse MALDI-TOF
<u>15</u>	16	1	0,7	
<u>16</u>	16	20	7,6	
<u>17</u>	4	6	1,1	
<u>18</u>	4	20	2,6	

Tableau III-1 : Les résultats présentés montrent qu'une concentration en protéine plus grande permet d'obtenir des taux de greffage plus élevés à nombre d'équivalents du composé 2 égal.

Un taux de greffage trop important risque de perturber grandement l'activité biologique de la protéine. En revanche, un taux de greffage trop faible conduira inévitablement à une baisse de la concentration en agent chélatant, ce qui peut réduire significativement la cinétique de radioméallation. La prise en compte de ces paramètres nous a conduit à choisir les composés 17 et 18 pour les étapes suivantes de radioméallation et de tests biologiques.

III.1.2.3 Radiomarquage du trastuzumab

Avant de pouvoir réaliser les tests *in vitro* et *in vivo*, il est nécessaire de mettre au point une méthode efficace et reproductible de radiomarquage. De nombreuses conditions de radioméallation ont été reportées dans la littérature, mais dans la majorité des cas, une solution tampon d'acétate d'ammonium est utilisée afin de neutraliser l'acidité de la solution de chlorure d'indium-111.

Nous avons donc réalisé le radiomarquage du composé **17** à $400 \text{ MBq} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéine dans un mélange de tampons acétate d'ammonium, phosphate (PBS) et HCl pour rester dans une gamme de pH comprise entre 4 et 5 (Schéma III-4).

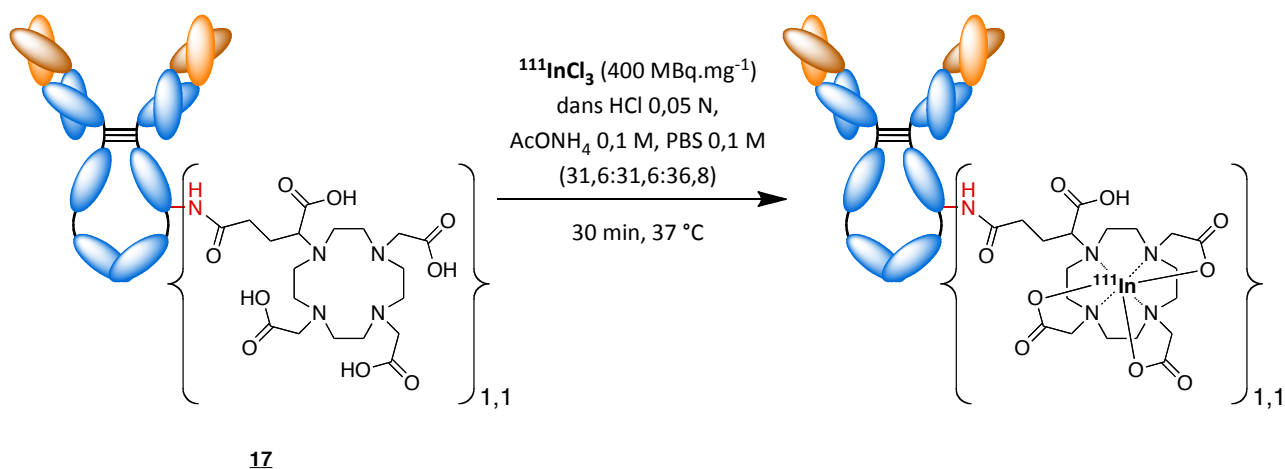
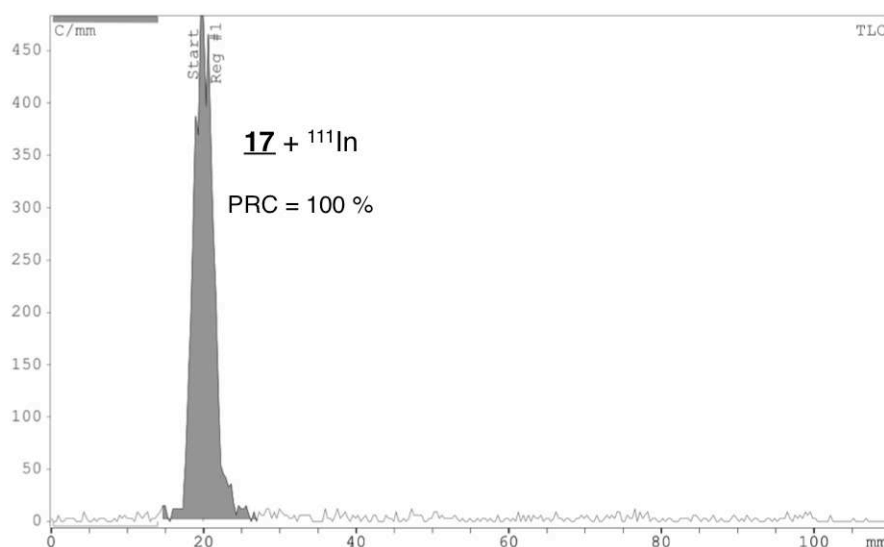


Schéma III-4

Si les premiers essais ne nous ont pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants, l'augmentation de la proportion de PBS (40 %) semble conduire à la formation du composé attendu. En effet, on observe sur le radiochromatogramme ITLC présenté en Figure III-5 un pic à 20 mm (point de dépôt) correspondant au radioimmunoconjugué désiré. Le pic de l'indium-111 libre entre 90 et 100 mm n'est pas observé, et ce composé peut donc *a priori* être directement utilisé pour des tests *in vitro* puis *in vivo* sans étape de purification.

Figure III-5 : Radiochromatogramme ITLC du composé **17** après radiomarquage à l'indium-111.

Un test de stabilité de l'anticorps radiomarqué a été réalisé par compétition avec un large excès de DTPA (1000 équivalents) dans le PBS à $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Une analyse par radio-ITLC a ensuite été réalisée et a montré un déplacement instantané de l'indium-111 dans le DTPA (Figure III-6).

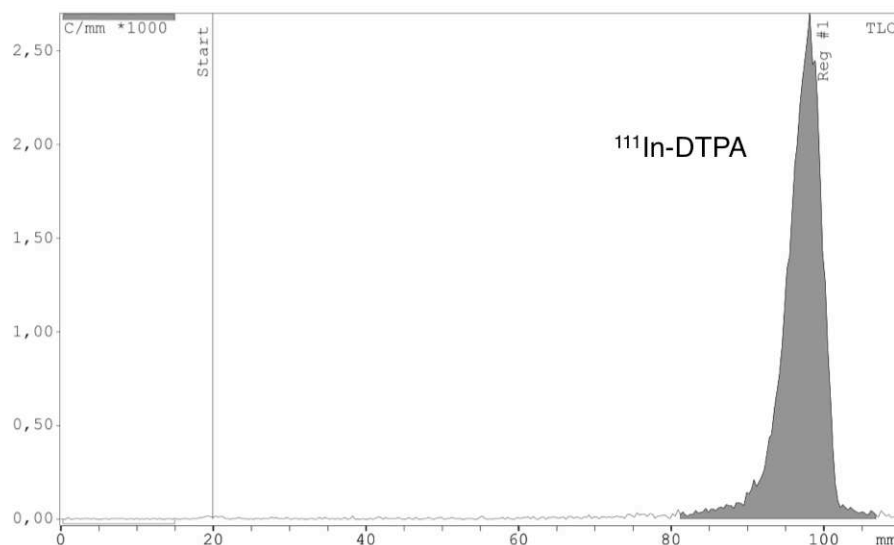


Figure III-6 : Radiochromatogramme ITLC du produit de radioméallation après compétition avec un excès de DTPA.

Une analyse approfondie de la littérature nous a permis de trouver une explication à ces résultats surprenants. En effet, les ions phosphate sont connus pour former des espèces insolubles en milieu aqueux avec de nombreux ions métalliques. Ainsi, l'indium-111 forme une suspension colloïdale avec les ions phosphates,^{226,227} ce qui explique la présence d'un seul pic de radioactivité au point de dépôt.

Afin de nous affranchir de ce problème, nous avons logiquement décidé d'éliminer toute trace d'ions phosphate de nos solution d'anticorps par une série de filtrations centrifuges et de rinçages avec un tampon acétate d'ammonium 0,1 M à pH = 5,7. Nous avons également décidé d'utiliser le composé **18** pour les expériences suivantes afin d'augmenter sensiblement la concentration de la solution en DOTA. Le composé **18** en solution dans un tampon acétate d'ammonium 0,1 M à pH = 5,7 a été radiomarqué à l'indium-111 (400 MBq.mg⁻¹) en solution dans HCl 0,05 N. Après optimisation des conditions de réactions le composé **19** a pu être obtenu (Schéma III-5).

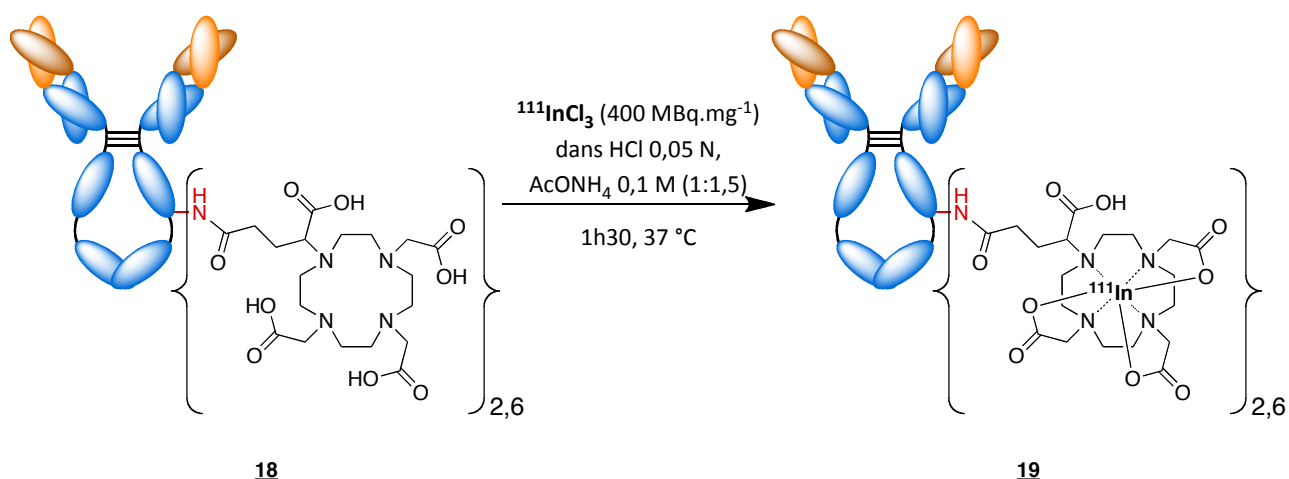


Schéma III-5

Une solution d'EDTA 0,1 M a ensuite été additionnée afin de piéger l'indium non complexé par les motifs DOTA. Cette procédure nous a permis d'obtenir un rendement de radiomarquage de 75 %, avec une pureté radiochimique > 99 % après purification par filtration centrifuge (Figure III-7).

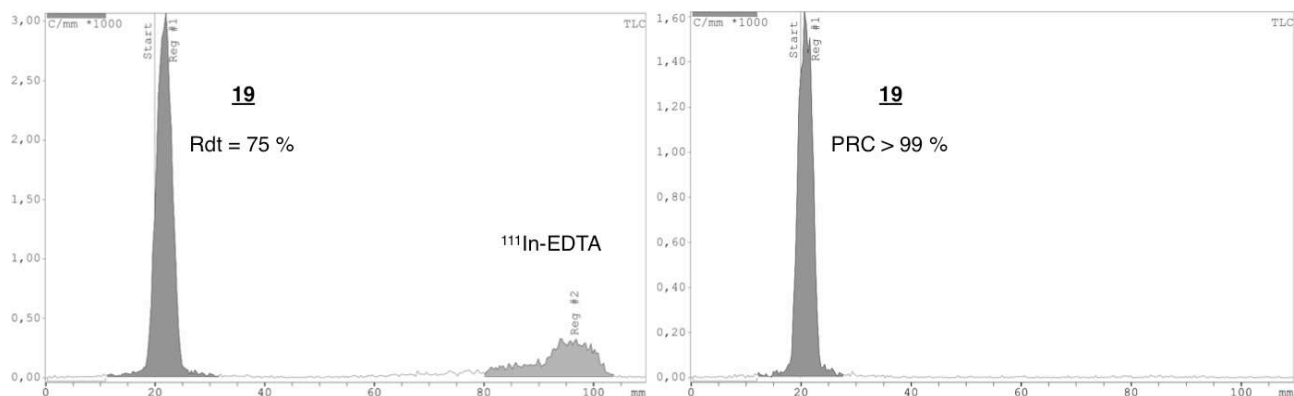


Figure III-7 : Radiochromatogrammes ITLC du composé **19** après addition d'EDTA en excès (gauche), puis après purification par filtration centrifuge (droite).

Notons que l'addition d'EDTA est une étape indispensable si l'on envisage des tests biologiques *in vitro* ou *in vivo*. En effet, le rendement de radiomarquage déterminé par ITLC diminue systématiquement d'environ 10 % après ajout d'un agent chélatant compétiteur ce qui laisse supposer une liaison aspécifique de l'indium-111 à l'anticorps. Bien évidemment, la purification du composé est également essentielle et permet par la même occasion de remplacer la solution tampon de marquage par une solution tampon compatible avec les applications en milieu biologiques, telle que le PBS.

III.1.2.4 Tests d'activité *in vitro*

Ces premières expériences de radiomarquage nous ont permis de mettre au point des conditions réactionnelles satisfaisantes. Cependant, avant de pouvoir étudier la biodistribution du traceur *in vivo*, il est nécessaire de s'assurer que l'anticorps conserve ses propriétés biologiques par des tests *in vitro*.

III.1.2.4.1 Détermination de l'affinité du ^{111}In -DOTAGA-trastuzumab

La première expérience de contrôle de l'activité consiste à déterminer l'affinité du trastuzumab radiomarqué pour son antigène HER2. L'affinité d'un anticorps (caractérisée par sa constante de dissociation K_d) pour sa cible est généralement de l'ordre de 10^{-9} - 10^{-10} M. Toute modification apportée à un anticorps a souvent pour conséquence une diminution de son affinité pour sa cible (cette diminution pouvant avoir aussi un impact sur la biodistribution et sur la capacité de l'analogue à s'accumuler dans les tumeurs). Il est donc nécessaire d'évaluer l'affinité des analogues du trastuzumab pour l'antigène HER2.

Pour comprendre l'importance et le principe de cette expérience, il est nécessaire de bien saisir les notions de liaison totale et de liaison non spécifique. La liaison totale est déterminée en incubant une quantité fixe de cellules surexprimant HER2 avec une quantité croissante de DOTAGA-trastuzumab marqué à l'indium-111 (Figure III-8). Après incubation, une série de lavage est effectuée afin d'éliminer le trastuzumab radiomarqué non lié aux cellules, et la radioactivité présente dans les cellules est comptée à l'aide d'un compteur gamma.

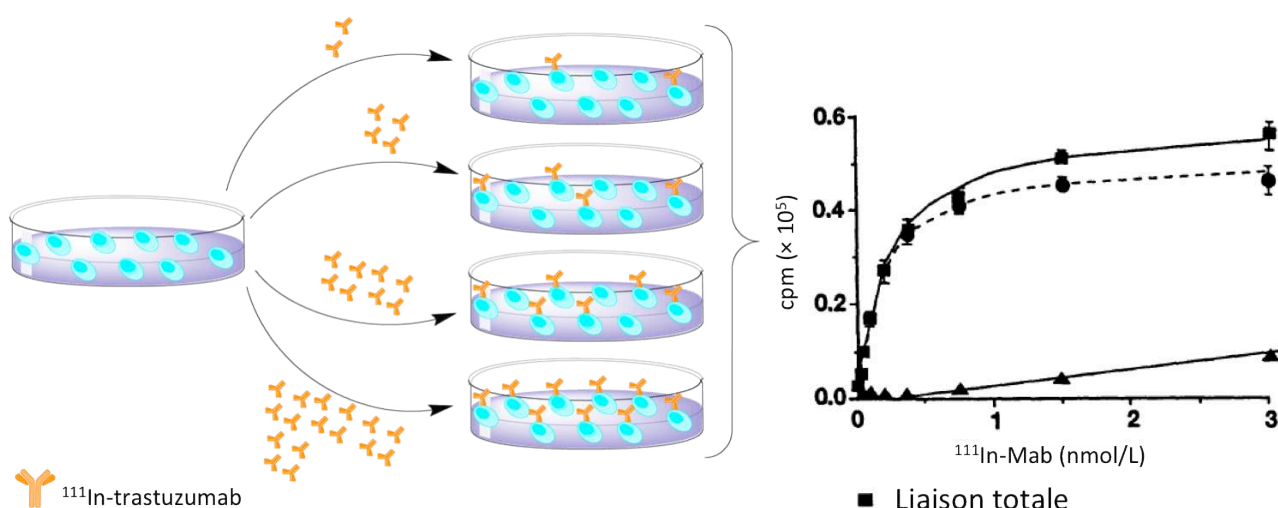


Figure III-8 : Les cellules surexprimant HER2 (en bleu clair) sont mises en présence d'une quantité croissante de trastuzumab radiomarqué. Lorsque tous les récepteurs HER2 sont occupés, la courbe de liaison totale atteint un plateau. (Extrait de Valenzano et al.)²²⁸

La liaison non spécifique de l'anticorps est déterminée en reprenant le même protocole que lors de la détermination de la liaison totale, à la différence qu'un large excès de trastuzumab "froid" est ajouté dans le milieu (Figure III-9). Comme précédemment, après incubation et lavage des milieux d'incubation, la radioactivité présente dans les cellules est comptée grâce à un compteur gamma.

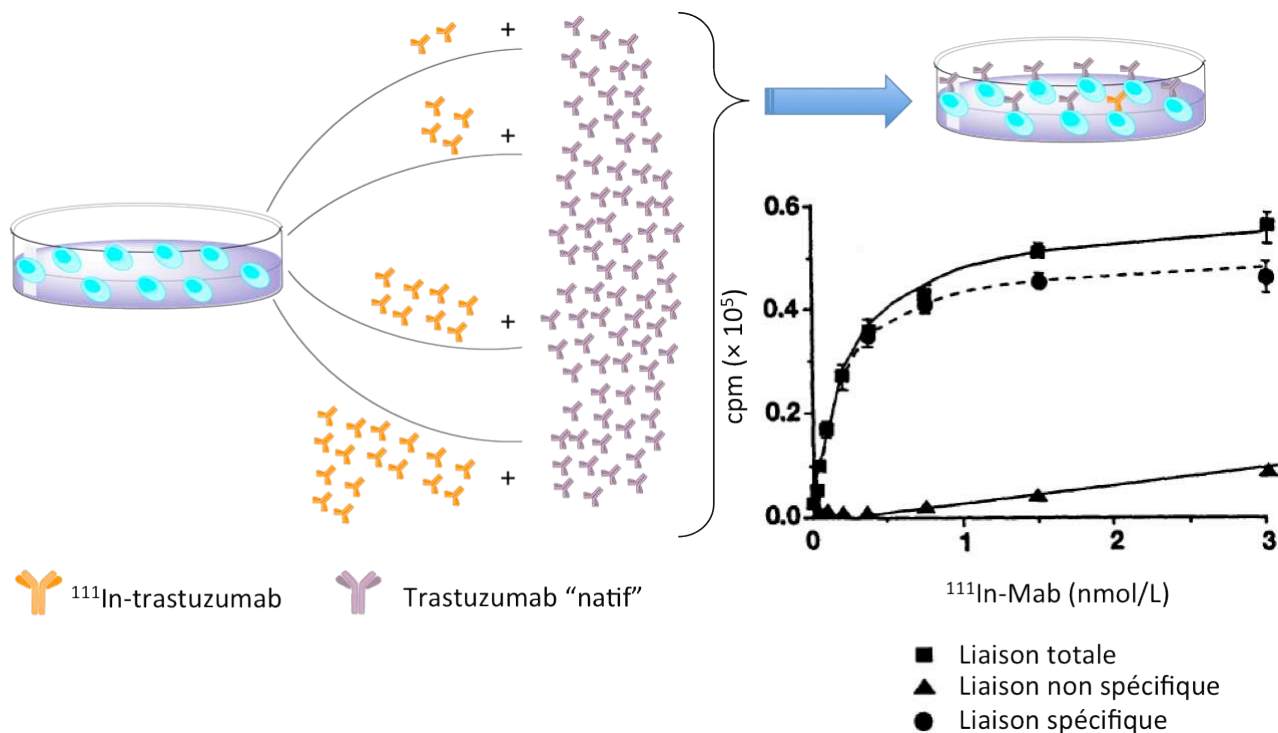


Figure III-9 : L'excès de trastuzumab entre en compétition avec le trastuzumab radiomarqué, et occupe donc statistiquement la quasi totalité des récepteurs HER2, permettant ainsi de tracer la courbe de liaison non spécifique. La courbe de liaison spécifique est ensuite obtenue par simple différence entre les courbes de liaisons totale et non spécifique. (Extrait de Valenzano et al.)²²⁸

Si l'on considère que le trastuzumab possède une affinité pour HER2 au moins égale à son homologue radiomarqué, la radioactivité présente dans les cellules devrait être quasi nulle. Dans le cas contraire, on assistera à une augmentation de la constante de dissociation, traduisant une mauvaise affinité de l'anticorps pour un antigène.

Les compteurs gamma à scintillation sont des appareils extrêmement sensibles mais ont tendance à très vite saturer. Dans ce contexte, il n'est alors pas nécessaire de réaliser un marquage du trastuzumab avec une haute activité spécifique puisqu'une activité spécifique trop élevée provoquerait une saturation du compteur et nous obligerait à attendre plusieurs jours la décroissance du radionucléide. Le composé **18** a donc été marqué à l'indium-111 à 150 MBq.mg^{-1} , et le composé **20** a été obtenu avec une activité spécifique d'environ 100 MBq.mg^{-1} avec une pureté radiochimique supérieure à 99 % (Schéma III-6).

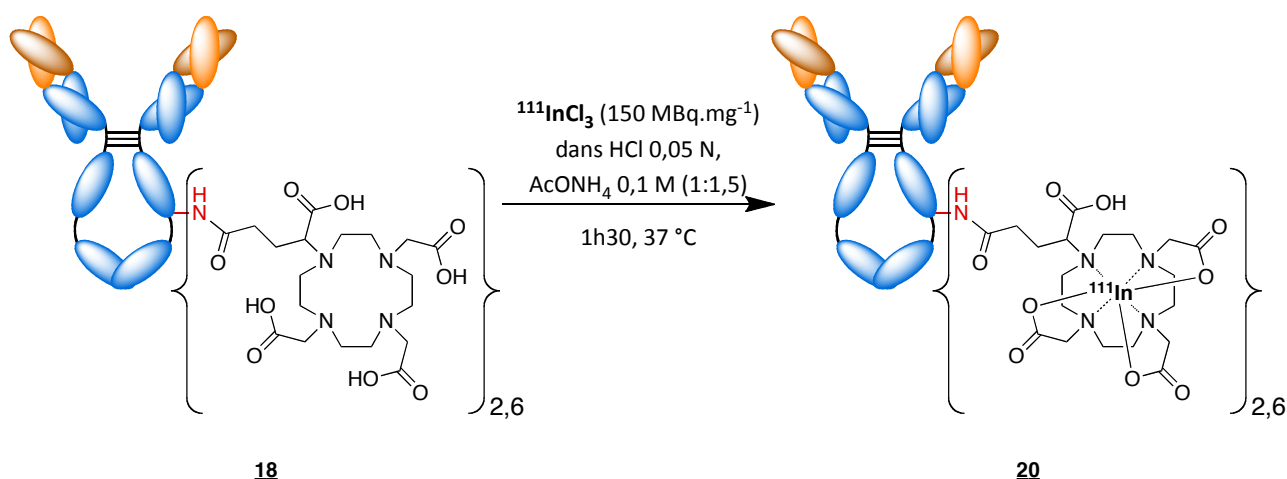


Schéma III-6

L'affinité du composé a ensuite été déterminée sur des cellules HCC1954 (cellules d'adénocarcinome mammaire humain) surexprimant l'antigène HER2 à leur surface, en suivant la méthode précédemment décrite. Les courbes de liaison totale et non spécifique ainsi obtenues ont montré une bonne affinité du ¹¹¹In-DOTAGA-trastuzumab pour HER2 (Figure III-10).

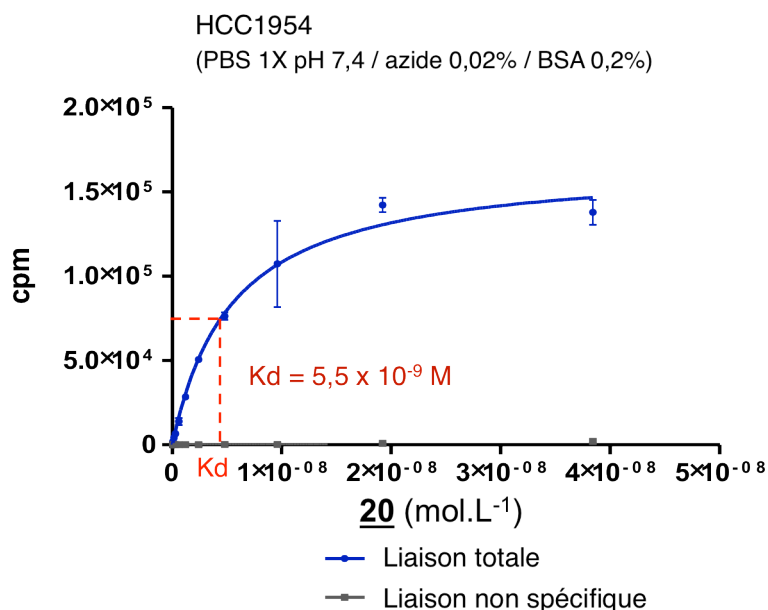


Figure III-10 : Courbes de liaison permettant de déterminer la constante de dissociation du ¹¹¹In-DOTAGA-trastuzumab.

La constante de dissociation K_d correspond à la concentration de ligand (ici d'anticorps) nécessaire pour occuper la moitié des sites de liaison (antigénique dans notre cas) et peut donc par conséquent être obtenue par simple lecture graphique. La valeur de cette constante ($K_d = 5,5 \times 10^{-9} \text{ M}$) est en accord avec les données de la littérature ($1,2 - 4,4 \times 10^{-9} \text{ M}$),^{229,230} nous permettant de poursuivre l'évaluation de notre anticorps radiomarqué.

III.1.2.4.2 Détermination de la fraction liable du ^{111}In -DOTAGA-trastuzumab

Avant de pouvoir réaliser la biodistribution *in vivo* du DOTAGA-trastuzumab, il est nécessaire de déterminer quelle est la fraction de l'analogue qui est réellement capable de se lier à l'antigène cible (fraction immunoréactive).

Pour ce faire, une quantité constante du composé **20** est mise en présence de quantités croissantes de cellules ($0,4$ à 24×10^6 cellules.mL⁻¹), et donc de l'antigène cible HER2. Lorsque la liaison aux cellules de l'analogue atteint son maximum, il est alors possible de déterminer sa fraction liable (Figure III-11). Comme pour la détermination de l'affinité, la liaison non spécifique est évaluée par addition d'un large excès de trastuzumab non marqué.

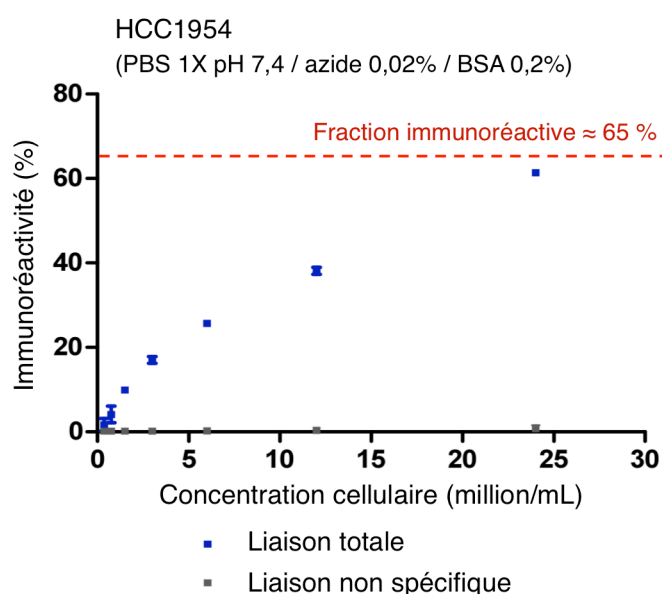


Figure III-11 : Courbes de liaison permettant de déterminer l'immunoréactivité du ^{111}In -DOTAGA-trastuzumab.

La fraction liable a été évaluée à environ 65 %, et bien que cette valeur soit sensiblement inférieure aux données de la littérature (85 – 87 %),^{96,182} celle-ci permet d'envisager une imagerie *in vivo* du trastuzumab radiomarqué. Notons cependant qu'un plateau n'ayant pas été atteint, la fraction liable est donc sous-évaluée.

III.1.2.5 Imagerie et biodistribution *in vivo* du ^{111}In -DOTAGA-trastuzumab

La dernière étape de notre travail a consisté à réaliser la biodistribution du DOTAGA-trastuzumab chez la souris porteuse d'une tumeur cancéreuse. Contrairement aux évaluations *in vitro*, une grande activité spécifique est nécessaire si l'on veut imager un petit animal avec un temps d'acquisition aussi court que possible. Nous nous sommes donc tout d'abord efforcés de réaliser le

marquage du composé **18** à l'indium-111 à une activité de 1 GBq.mg⁻¹. Le fait d'augmenter l'activité spécifique du traceur a pour conséquence de diluer le milieu réactionnel, puisqu'un ajout de solution tampon est nécessaire pour contrer l'augmentation de solution acide mise en jeu. Nous avons donc adapté nos conditions de marquage en allongeant la durée de métallation à 3 h (Schéma III-7). Le composé **21** est finalement obtenu, après purification, avec une activité spécifique de 620 MBq.mg⁻¹ de trastuzumab.

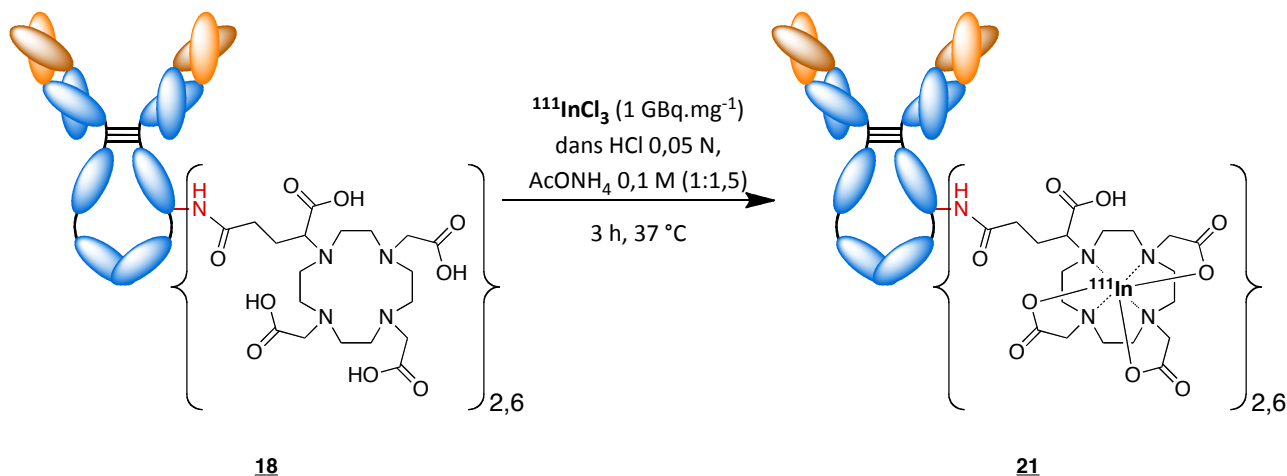


Schéma III-7

La stabilité du radiochélate a été évaluée par un test de compétition avec un large excès de DTPA. Le composé **21** (10 µg, 6,6 MBq) a été incubé cinq jours à 4 °C dans 1 mL de PBS en présence de 2000 équivalents de DTPA. Des ITLCs ont été réalisées chaque jour afin d'observer un éventuel phénomène de transchélation du DOTAGA au DTPA. La pureté radiochimique du composé **21** (99 %) n'a pas évolué durant les cinq jours de l'expérience, confirmant l'excellente stabilité du complexe ¹¹¹In-DOTAGA.

La capacité du ¹¹¹In-DOTAGA-trastuzumab à cibler une tumeur surexprimant HER2 a été évaluée sur des souris balb/c Nude porteuses de tumeurs mammaires humaines BT-474 greffées en sous-cutané. Dans une première expérience, 25 µg du composé **21** (200 µL, 13-15 MBq) ont été administrés aux souris par injection dans la veine de la queue. Des projections tomographiques TEMP-TDM ont ensuite été enregistrées 24, 48 et 72 heures après l'injection (Figure III-12).

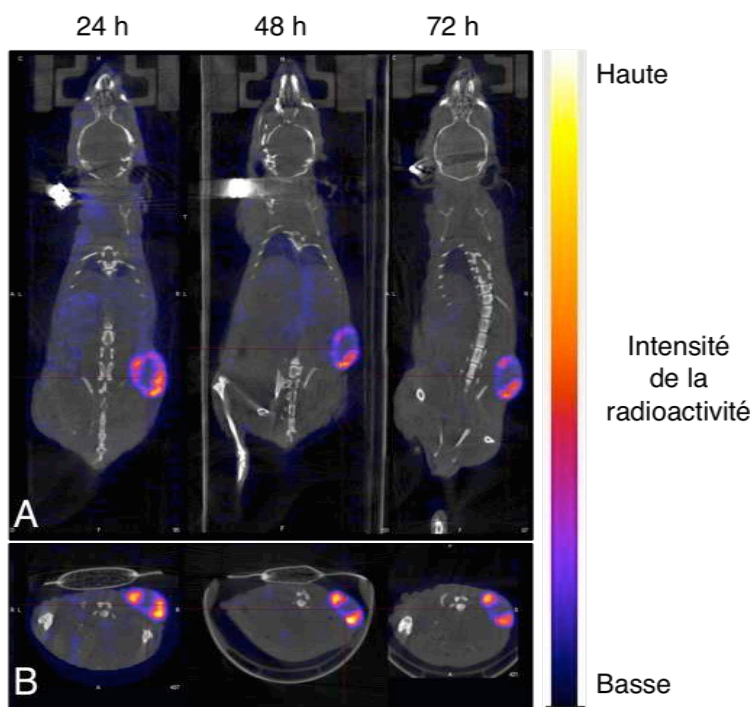


Figure III-12 : Images TEMP-TDM d'une souris portant une tumeur mammaire humaine BT-474 (A : coupes coronales ; B : coupes transversales) 24, 48 et 72 heures après injection du radiotracer **21**.

L'analyse de ces images a montré que la fixation tumorale atteint $11,0 \pm 5,6$; $13,1 \pm 7,6$; et $14,0 \pm 8,1$ %ID (% de la dose injectée) à 24, 48 et 72 heures après injection respectivement. Ces données indiquent que l'accumulation du composé **21** dans la tumeur atteint un plateau 24 heures seulement après injection du traceur. On notera que la majorité de la radioactivité s'accumule dans les pourtours de la tumeur plutôt qu'au centre, ce qui est probablement dû à une nécrose du centre de la tumeur. Après le dernier temps d'imagerie, les animaux ont été sacrifiés et la radioactivité dans la tumeur, le sang, et les différents organes, a été comptée. Les résultats sont regroupés dans la Figure III-13 et montrent une excellente accumulation du radiotracer au niveau de la tumeur ($66,9 \pm 0,9$ %ID/g).

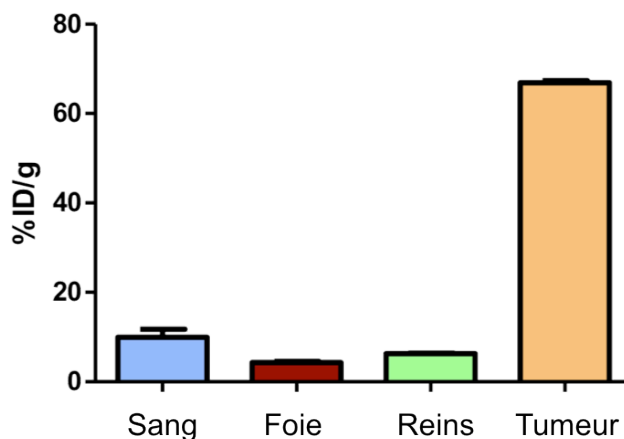


Figure III-13 : Activité présente dans les différents organes (en % de dose injectée par gramme) 72 heures après injection du composé **21**.

Ces résultats démontrent ainsi l'efficacité et l'affinité du traceur pour sa cible. Dans une seconde expérience, nous avons voulu mettre en évidence la spécificité du traceur pour le récepteur HER2. Le radiomarquage du composé **18** a donc à nouveau été réalisé en utilisant cette fois du chlorure d'indium-111 fourni par Perkin-Elmer (qualité radiopharmaceutique, uniquement pour la recherche) en lieu et place de Covidien (qualité clinique, administrable à l'humain). Étonnamment, le rendement de radiomarquage du composé **21** s'est avéré bien plus faible (20 %) que lors des expériences précédentes. D'autres tests de radiomarquage sont venus confirmer ces résultats, et nous avons par conséquent attribué cette diminution du rendement de radiomarquage à une pureté moindre (présence d'impuretés métalliques) du radionucléide fourni par Perkin-Elmer. Néanmoins, le traceur une fois purifié a pu être utilisé pour les tests *in vivo*.

Dans cette seconde expérience, les souris ont reçu une injection de 25 μg du composé **21** (200 μL , 3-3,5 MBq) seul ou co-injecté avec un excès de trastuzumab ($\times 100$). Des images TEMP-TDM enregistrées 72 heures après injection nous ont permis d'observer l'influence de l'excès de trastuzumab sur la fixation du traceur sur la tumeur (Figure III-14).

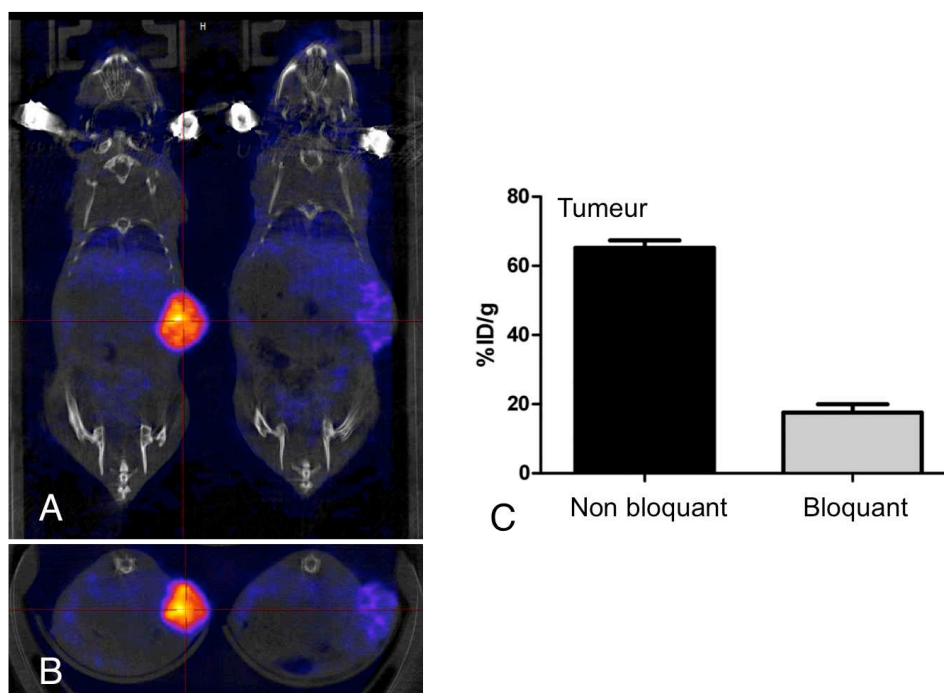


Figure III-14 : Images TEMP-TDM de deux souris portant chacune une tumeur mammaire humaine BT-474 (A : coupes coronales ; B : coupes transversales) 72 heures après injection du composé **21** seul (gauche) ou coinjecté avec un excès de trastuzumab (droite). C : Accumulation de la radioactivité dans la tumeur 72 heures après injection sans (non bloquant) ou avec co-injection d'un excès de trastuzumab (bloquant).

L'accumulation de la radioactivité dans la tumeur est réduite de $65,2 \pm 2,1$ à $17,6 \pm 2,4$ %ID/g 72 heures après injection, démontrant ainsi la spécificité de notre traceur puisque l'excès de trastuzumab a grandement empêché la liaison du traceur avec HER2. D'autre part, la persistance de la radioactivité dans le sang n'est pas affectée par l'injection de trastuzumab non marqué ($10,0 \pm 2,7$ contre $11,9 \pm 0,7$ %ID/g). Ces résultats suggèrent que la co-injection de trastuzumab n'a pas d'influence sur la cinétique plasmatique du ^{111}In -DOTAGA-trastuzumab. Notons que des résultats similaires sont obtenus lorsque l'excès de trastuzumab est administré 24 heures avant l'injection du composé **21**.

Ces résultats très satisfaisants font du DOTAGA-anhydride un agent chélatant bifonctionnel de choix pour le radiomarquage d'anticorps. Il nous a donc paru logique de l'utiliser pour le marquage d'un second anticorps d'intérêt.

III.1.3 Marquage du cétuximab

III.1.3.1 Le cétuximab : état de l'art

Le cétuximab (Erbix[®], Merck) est un anticorps monoclonal chimérique de la famille de IgG dirigé contre le récepteur HER1 (Human Epidermal growth factor Receptor 1) également appelé EGFR1 ou ErbB-1. HER1 est, tout comme HER2, une protéine transmembranaire impliquée dans la croissance, la multiplication et la survie des cellules. HER1 est surexprimé dans environ un tiers de l'ensemble des cancers humains (poumons, anus, glioblastomes multiformes, colorectal, tête et cou, etc.) et cette surexpression est directement corrélée à la croissance de la tumeur et à sa progression.²³¹⁻²³³ Plus particulièrement, dans le cas de cancers colorectaux, un niveau d'expression élevé de HER1 est très souvent associé à une agressivité accrue de la maladie et un mauvais pronostic de survie.

Tout comme le trastuzumab avec HER2, le cétuximab inhibe les processus liés à la croissance cellulaire par sa liaison au domaine extracellulaire de HER1, et de la même manière, il est généralement utilisé en combinaison avec d'autres traitements anticancéreux. Il est autorisé pour le traitement de certains cancers colorectaux et de cancers tête et cou, et fait actuellement l'objet de nombreux essais cliniques sur d'autres types de cancers à tumeurs solides (bronchique non à petites cellules, pancréatique, cervical, ovarien, rectal, péritonéal primaire, etc.).²³⁴⁻²³⁷

Même s'il est possible de déterminer un statut HER1 par les techniques FISH ou ICH,^{238,239} ces méthodes ne permettent pas d'obtenir des résultats reproductibles. Par conséquent, contrairement au trastuzumab, aucune détermination du statut HER1 n'est réellement réalisée en clinique et seul le type de cancer considéré influe sur le choix d'un traitement par le cétuximab. En nous appuyant sur notre première expérience concluante du marquage du trastuzumab, nous avons donc décidé de réaliser le radiomarquage du cétuximab. Cet anticorps a récemment fait l'objet de plusieurs radiomarquages pour l'imagerie, notamment avec des radionucléides tels que le cuivre-64, l'indium-111, le lutétium-177, ou encore l'yttrium-86.^{135,181,240-242} À nouveau, ces outils permettent une meilleure compréhension du développement des différentes tumeurs étudiées, et offrent la perspective de mieux combattre ces maladies. Une fois encore, aux vues de la grande diversité de cancers surexprimants HER1, il est nécessaire de développer de nouveaux traceurs performants pour une détection spécifique d'un type de tumeur.

III.1.3.2 Greffage du DOTAGA-anhydride

Nous nous sommes basés sur les résultats obtenus avec le trastuzumab pour réaliser le greffage du composé **2** sur le cétuximab purifié **22**. Le composé **23** a ainsi pu être obtenu selon le même protocole que celui utilisé pour la synthèse du composé **18** (Schéma III-8).

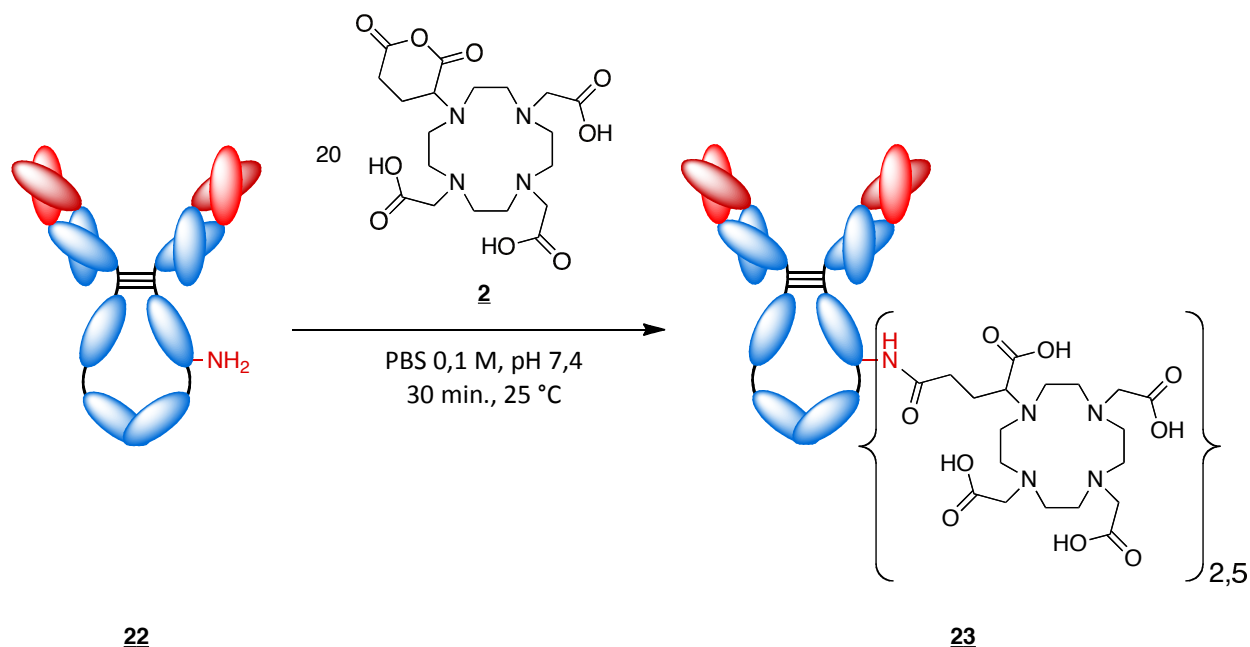


Schéma III-8

Le taux de greffage, déterminé par spectrométrie de masse MALDI-TOF, est comparable à celui obtenu pour le composé **18**, avec 2,5 unités macrocycliques par cétuximab en moyenne (Figure III-15).

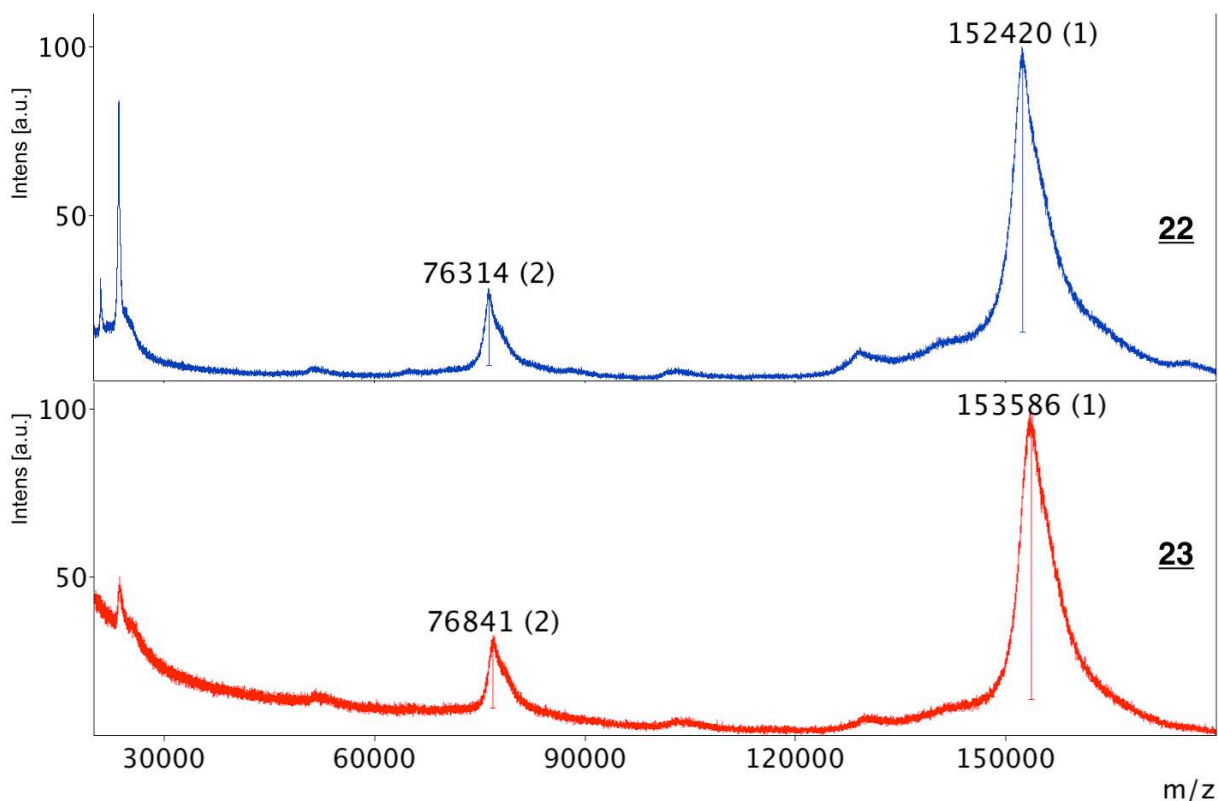


Figure III-15 : Spectres de masse MALDI-TOF des composés **22** et **23**. Les chiffres entre parenthèse indiquent la charge de l'espèce.

Ces résultats sont en parfait accord avec ceux obtenus lors de la synthèse du composé **18**, et nous avons donc envisagé le radiomarquage du composé **23** par l'indium-111 afin de réaliser les validations *in vitro* et *in vivo*.

III.1.3.3 Radiomarquage du cétuximab et tests d'activité *in vitro*

Afin de réaliser les tests *in vitro* sur le DOTAGA-cétuximab, nous avons réalisé la radioméallation du composé **23** dans des conditions similaires à la synthèse du composé **20** (100 MBq.mg⁻¹ de protéine). Le composé **24** est obtenu avec un rendement de radiomarquage de 58 % et une activité spécifique de 87 MBq.mg⁻¹ de protéine (Schéma III-9). Ce rendement relativement faible est encore une fois attribué à l'utilisation du chlorure d'indium-111 fourni par Perkin-Elmer, mais une étape de purification du composé permet d'isoler le composé **24** avec une pureté radiochimique > 99 %.

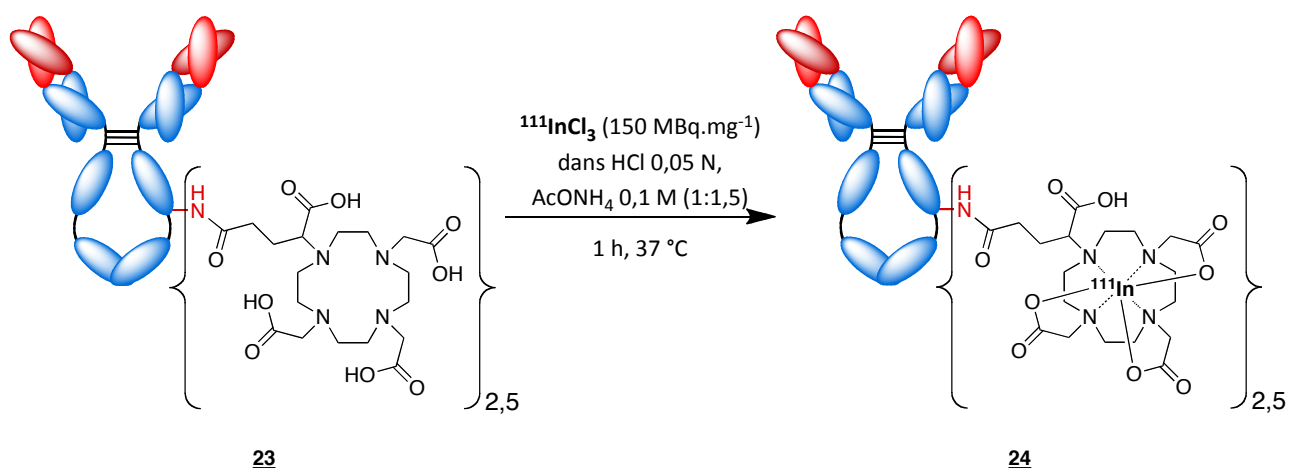


Schéma III-9

III.1.3.3.1 Détermination de l'affinité du ¹¹¹In-DOTAGA-cétuximab

Comme pour chaque nouveau radioimmunoconjugué, une étape de contrôle de l'activité biologique *in vitro* s'impose. L'affinité du composé **24** a été déterminée sur des cellules A-431 (modèle de carcinome épidermoïde) surexprimant HER1 à leur surface. Les courbes de liaison totale et non spécifique ainsi obtenues ont montré une bonne affinité du radioimmunoconjugué pour HER1 (Figure III-16).

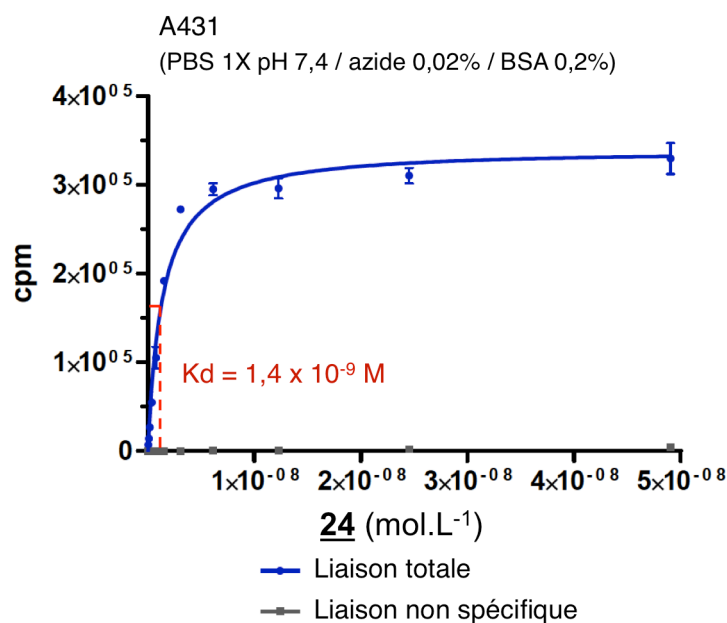


Figure III-16 : Courbes de liaison permettant de déterminer la constante de dissociation du ¹¹¹In-DOTAGA-cétuximab.

La constante de dissociation déterminée ($K_d = 1,4 \times 10^{-9} \text{ M}$) est en accord avec les données de la littérature ($2,3 - 3,0 \times 10^{-9} \text{ M}$),²⁴³⁻²⁴⁵ et nous avons donc logiquement poursuivi l'évaluation de l'immunoconjugué par des tests d'immunoréactivité.

III.1.3.3.2 Détermination de la fraction liable du ¹¹¹In-DOTAGA-cétuximab

Toujours en nous appuyant sur le protocole mis au point pour le trastuzumab, nous avons déterminé l'immunoréactivité du composé **24**. Nous avons une nouvelle fois incubé une quantité croissante de cellules A-431 ($0,4$ à $24 \times 10^6 \text{ cellules.mL}^{-1}$) avec une quantité fixe du composé **24**. Les courbes de liaison spécifique et non spécifique obtenues nous permettent ensuite de déterminer la fraction liable (Figure III-17).

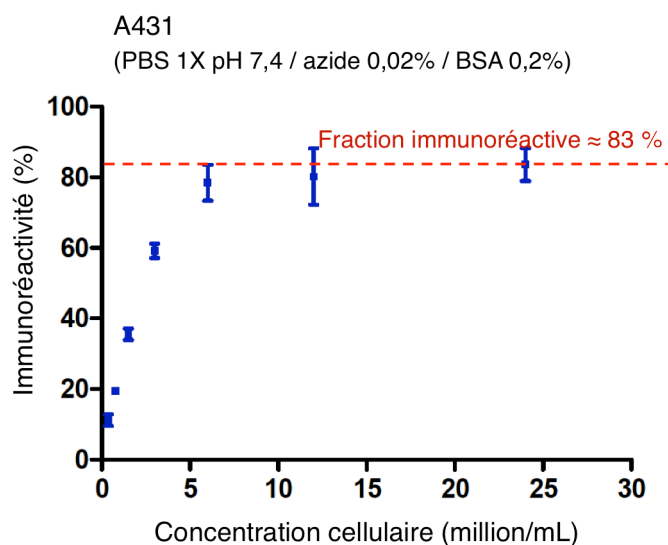


Figure III-17 : Courbes de liaison permettant de déterminer l'immunoréactivité du ¹¹¹In-DOTAGA-cétuximab.

La fraction liable a été estimée à 83 %, et ces données similaires à celles de la littérature (65 – 75 %)¹³⁵ nous permettent d'évaluer la biodistribution du radiotracer *in vivo* par TEMP.

III.1.3.4 Imagerie et biodistribution *in vivo* du ¹¹¹In-DOTAGA-cétuximab

Nous avons réalisé la biodistribution du DOTAGA-cétuximab chez la souris SWISS Nude porteuse d'une tumeur A-431 greffée en sous cutanée. Dans un premier temps, nous avons donc marqué le composé **23** à l'indium-111 avec une activité spécifique visée de 1 GBq.mg^{-1} . Malheureusement, toujours pour des raisons supposées de pureté de la source d'indium, nous n'avons pas été en mesure d'obtenir le composé **25** avec une activité spécifique supérieure à 320 MBq.mg^{-1} après lavage à l'EDTA puis purification (Figure III-18).

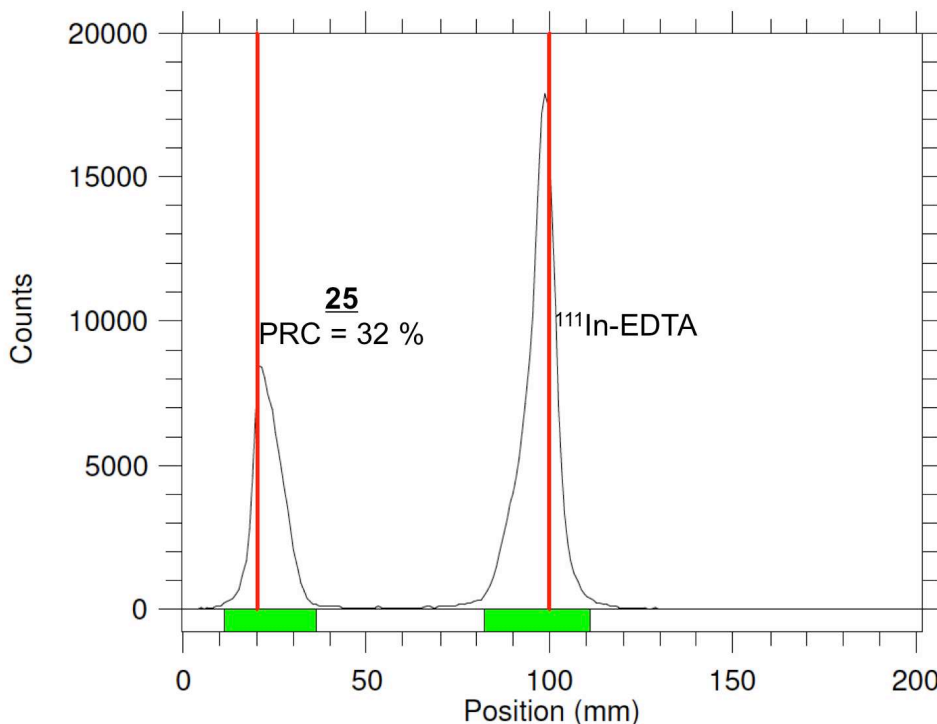


Figure III-18 : Radiochromatogramme ITLC du composé **25** après addition d'un excès d'EDTA.

La capacité du ^{111}In -DOTAGA-cétuximab à cibler une tumeur surexprimant HER1 a été évaluée après administration aux souris de 25 μg du composé **25** (200 μL , 2,5-5 MBq) par injection dans la veine de la queue, et des projections tomographiques TEMP-TDM ont été enregistrées à différents temps après l'injection (6 à 72 heures) (Figure III-19).

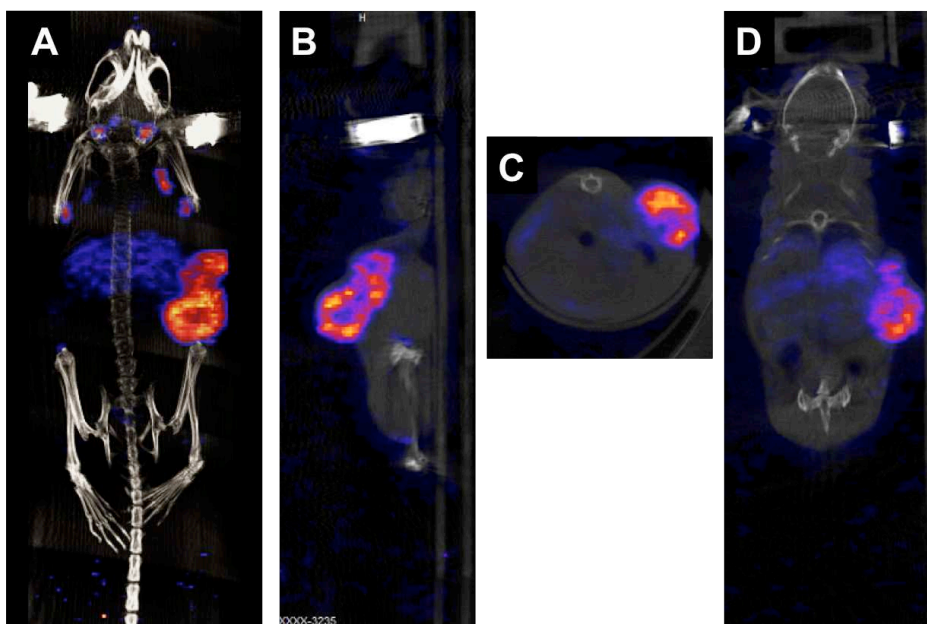


Figure III-19 : Images TEMP-TDM (A : MIP ; B : coupe sagittale ; C : coupe transversale ; D : coupe coronale) d'une souris portant une tumeur A-431 72 heures après injection du composé **25**.

L'analyse de ces images a montré que la fixation tumorale augmente continuellement durant toute la durée de l'étude sans jamais atteindre de plateau. Les animaux ont été divisés en deux sous-groupes. Les animaux du premier groupe ont été sacrifiés 48 heures après injection, tandis que ceux du deuxième groupe ont été sacrifiés 72 heures après injection. Pour chaque groupe, la radioactivité dans la tumeur, le sang, et les différents organes, a été comptée. Les résultats sont regroupés dans la Figure III-20 et confirment une accumulation progressive du radiotracer au niveau de la tumeur ($26,6 \pm 9,4$ %ID/g à 72 heures).

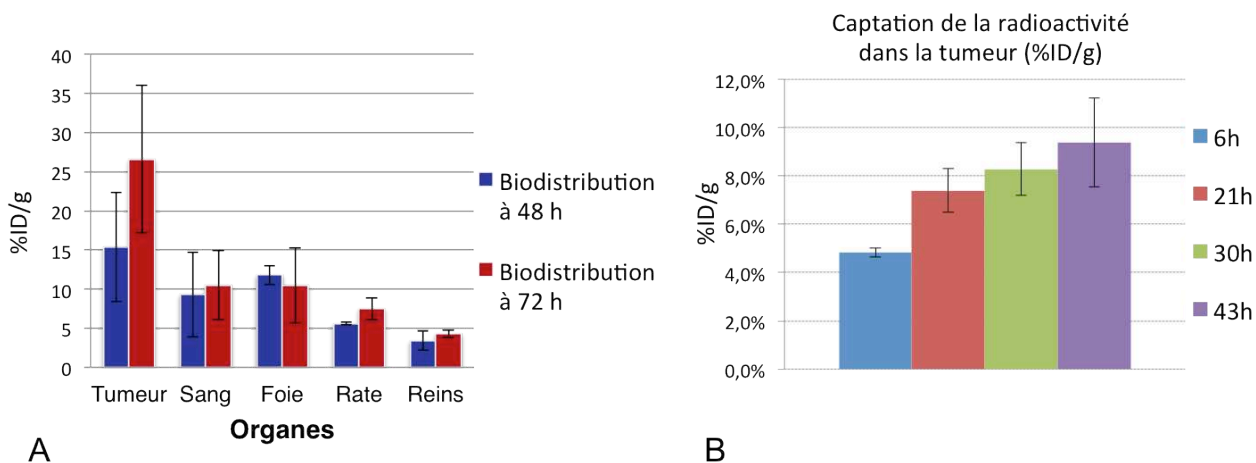


Figure III-20 : A : Activité présente dans les différents organes (en % de dose injectée par gramme) 48 et 72 heures après injection du composé **25**. B : Évolution de la captation de la radioactivité dans la tumeur au cours du temps.

Les grandes différences d'accumulation entre les différents animaux pourraient s'expliquer par une grande disparité dans la taille et l'évolution des tumeurs de chaque animal (variations de l'expression des antigènes à la surface des cellules, de leur métabolisme, etc.). Ces résultats préliminaires nécessiteront donc d'être affinés par des études complémentaires.

III.2 Greffage d'agents chélatants bifonctionnels sur l'abciximab

Nous avons évoqué dans le chapitre précédent les bénéfices que peuvent apporter l'imagerie médicale ciblée dans le milieu de l'oncologie. Cependant, d'autres champs d'applications peuvent être explorés grâce à cette technique afin de mieux comprendre certains phénomènes physiopathologiques. Ainsi, les anticorps monoclonaux trouvent également des applications cliniques, notamment dans le domaine du contrôle de l'hémostase. La section suivante porte sur le greffage de dérivés macrocycliques sur un fragment d'anticorps monoclonal, en vue d'une utilisation en TEMP. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec la société NVH Medicinal dans le cadre du projet Pharm'image®.

III.2.1 L'abciximab : état de l'art

III.2.1.1 L'abciximab : agent thérapeutique et potentiel en imagerie

L'abciximab (ReoPro®, Eli Lilly) est un fragment d'anticorps de type Fab issu d'une IgG. Il est utilisé comme antiagrégant plaquettaire en clinique, notamment dans le cas d'angioplasties ou de syndromes coronariens aigus. L'agrégation plaquettaire est un processus complexe mettant en jeu de nombreuses protéines et récepteurs, mais certains processus clés peuvent être ciblés afin d'inhiber l'agrégation. La glycoprotéine IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) est présente à la surface des plaquettes et, après activation, a pour rôle de se lier au fibrinogène lors de la coagulation, formant ainsi un réseau réticulé composé de plaquettes et de fibrinogène. L'affinité de l'abciximab pour GPIIb/IIIa empêche la formation de ce réseau et donc à terme, la formation d'un caillot dû à la coagulation (Figure III-21).

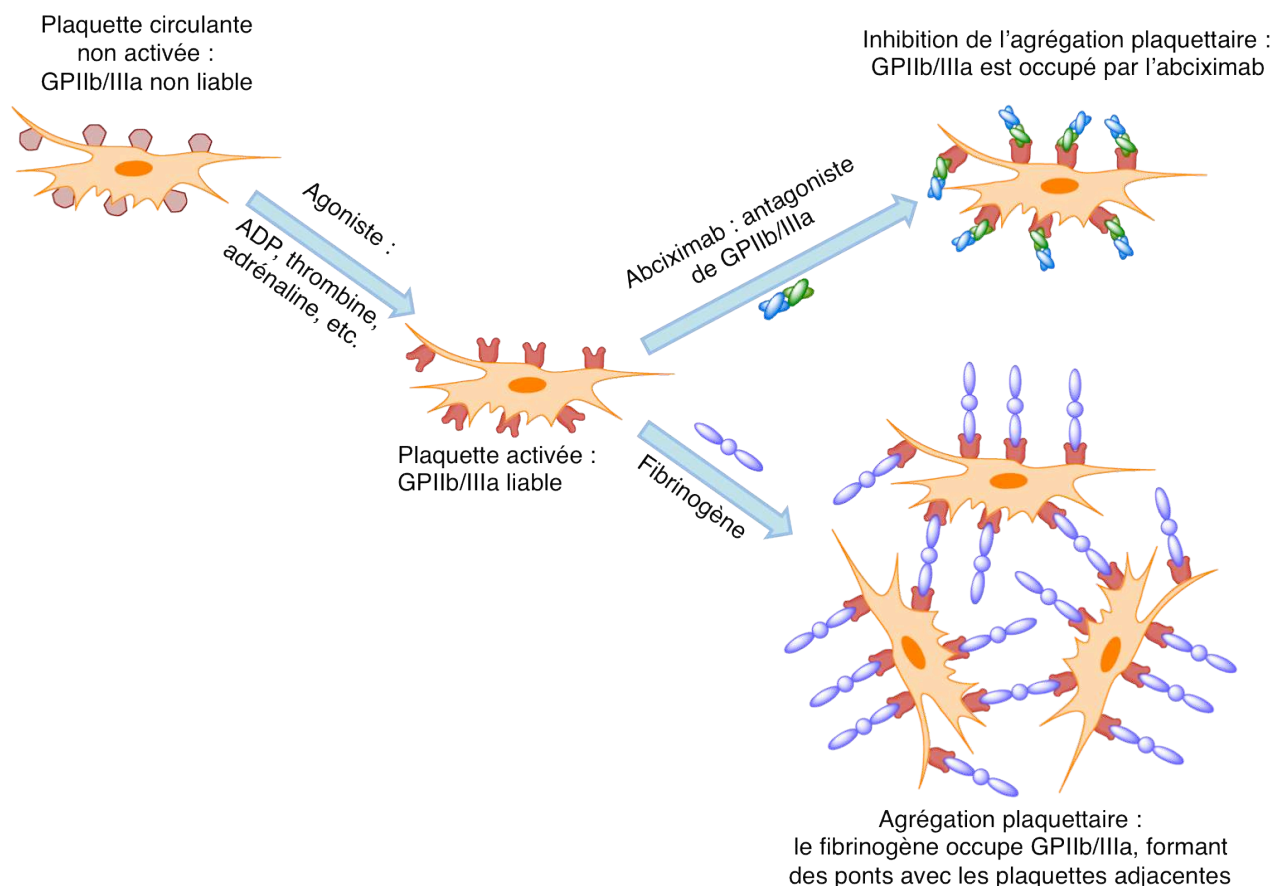


Figure III-21 : Mode d'action de l'abciximab

L'agrégation plaquettaire est un processus naturel de réparation des lésions vasculaires. Cependant, des dérèglements de l'hémostase (processus physiologique permettant d'arrêter le saignement) peuvent survenir et conduire à la formation d'un caillot sanguin (ou thrombus) trop important qui peut obstruer le vaisseau. Si l'obstruction d'un petit vaisseau peut paraître relativement anodine, les conséquences peuvent être beaucoup plus graves si le vaisseau lésé alimente une zone sensible du corps (cœur, cerveau, etc.). L'utilisation d'un antiagrégant plaquettaire permet alors d'aider à la désagrégation du caillot sanguin.

Les troubles cardiovasculaires font partie des affections les plus répandues dans la société actuelle, et certaines atteintes du système cardiovasculaire pourraient être traitées plus aisément si elles étaient détectées de façon plus précoce. En effet, un caillot sanguin ne bouche pas immédiatement un vaisseau lors de sa formation, et il peut s'écouler plusieurs mois avant la survenue d'un accident grave. Dans ce contexte, la détection de thrombus par TEMP-TDM nous semble un moyen simple et efficace de déterminer précisément la présence ou non de pathologies cardiovasculaires. En effet, la concentration en sites GPIIb/IIIa sera plus importante au niveau d'un thrombus que dans le reste du corps, et l'on devrait donc observer une accumulation d'abciximab au niveau du site d'agrégation. En outre, le suivi de dégradation du thrombus pourrait apporter de nouvelles informations utiles à la compréhension du mécanisme de dissolution.

Peu d'exemples existent dans la littérature concernant l'utilisation de l'abciximab en imagerie. À notre connaissance, seul le greffage de l'abciximab sur des microbulles a été rapporté, dans le cadre d'une utilisation en échographie.^{246,247} Ces travaux ont montré des résultats encourageants concernant la détection de thrombus à l'échelle du vaisseau sanguin, soulignant l'intérêt de tels examens dans le cadre de la prévention des accidents vasculaires cérébraux. Dans notre cas, une détection par TEMP permettrait une localisation sur l'ensemble du corps, apportant des informations complémentaires et préliminaires aux travaux mentionnés ci-dessus.

III.2.1.2 Contrôle de l'activité biologique de l'abciximab

L'abciximab est un fragment d'anticorps (Fab), et sa masse moléculaire est donc réduite, permettant une clairance plus rapide de la biomolécule. Cependant, le nombre de sites potentiels de greffage se trouve considérablement réduit, et il convient donc de maîtriser au mieux le taux de greffage ainsi que la position du site de greffage. L'activité biologique de l'abciximab conditionne l'inhibition ou non de l'agrégation plaquettaire, et cette propriété permet de tester son activité sans avoir recours, dans un premier temps, aux techniques nécessitant un radiomarquage.

Le test utilisé afin de contrôler l'activité de l'abciximab repose sur le principe de l'agrégométrie et est directement lié à la capacité d'inhibition plaquettaire de l'anticorps. L'agrégométrie (Figure III-22) consiste à évaluer la formation d'agrégats plaquettaires *in vitro* après activation des plaquettes par des agonistes variés (dans notre cas, l'ADP). Ce test est effectué classiquement sur du plasma riche en plaquettes (PRP)²⁴⁸ issu de la centrifugation à faible vitesse du sang prélevé dans un tube contenant un anticoagulant adapté.²⁴⁹ L'agrégation plaquettaire est ensuite mesurée par une technique photométrique sur un agrégomètre puis traitée par un logiciel dédié. Expérimentalement, une agrégation "normale" se traduira par une élévation de la courbe d'agrégation (100 % d'agrégation), tandis qu'en présence d'un antiagrégant plaquettaire, la courbe ne montrera pas d'augmentation (0 % d'agrégation).

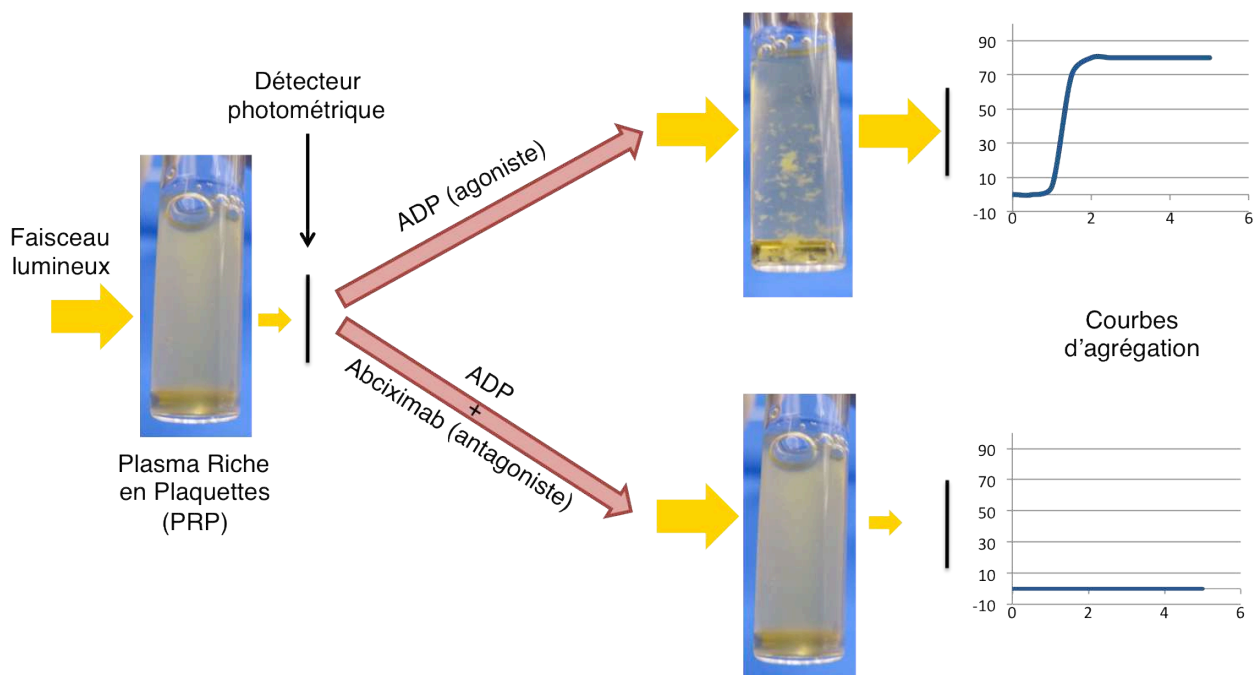


Figure III-22 : Principe du test d'agrégométrie. L'évolution de l'intensité lumineuse reçue par le détecteur au cours du temps permet de tracer les courbes d'agrégation.

L'activité antiagrégante de l'abciximab est "dose dépendante", et il convient donc dans notre cas de nous placer dans des conditions d'inhibition de l'agrégation limite puisque dans ce cas, la moindre variation d'activité est observable. Nous avons donc utilisé cette expérience afin de contrôler tous les immunoconjugués que nous avons synthétisés.

III.2.2 Greffage de dérivés du DOTA sur l'abciximab

III.2.2.1 Greffage du DOTAGA-anhydride

La méthode de greffage du composé **2** sur le trastuzumab et le cétuximab s'est montrée fructueuse et nous avons donc logiquement reproduit l'expérience avec l'abciximab. Afin de déterminer le meilleur ratio macrocycle / anticorps à engager, nous avons fait varier le nombre d'équivalent de macrocycle par rapport au Fab. Un gradient (m) de 1 à 20 équivalent du composé **2** a été mis en présence d'abciximab purifié **26** dans du PBS et l'ensemble a ensuite été agité pendant 1 heure à 25 °C (Schéma III-10).

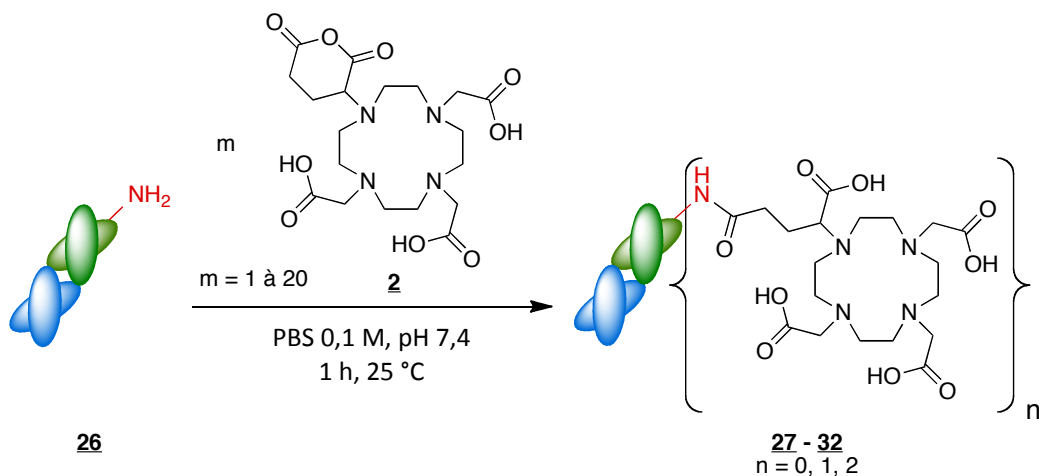


Schéma III-10

Après purification, les composés **27** à **32** ont été caractérisés par spectrométrie de masse MALDI-TOF afin de déterminer les taux de greffage respectifs. L'analyse des différents spectres présentés en Figure III-23 montre une augmentation du taux de greffage de 0 DOTAGA à un mélange de 0, 1 et 2 DOTAGA par abciximab. L'augmentation du taux de greffage suit logiquement l'augmentation de la proportion de DOTAGA-anhydride engagée dans la réaction.

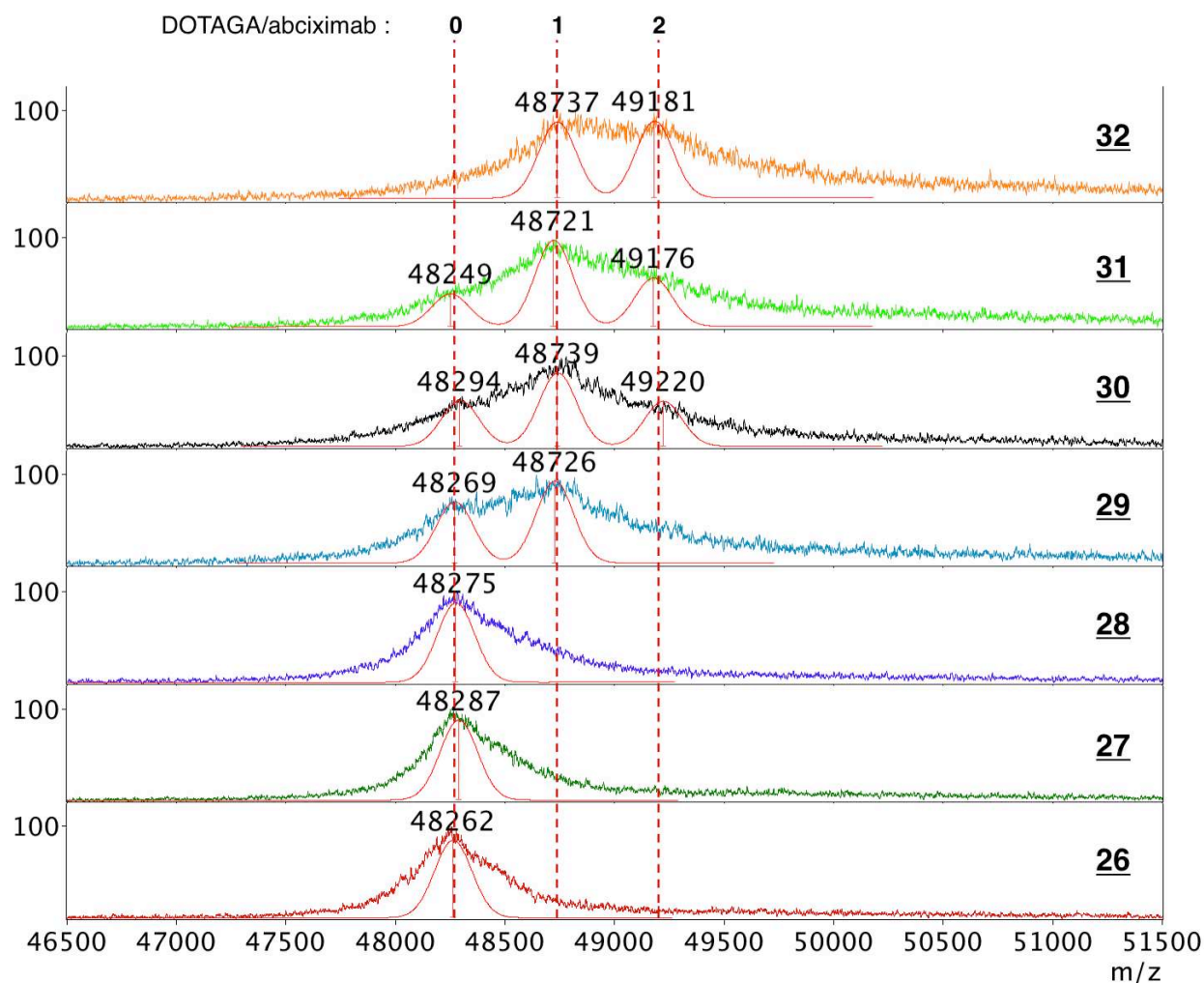


Figure III-23 : Spectres de masse MALDI-TOF des composés **26** à **32** (pic moléculaire). Les spectres simulés (en rouge) permettent de mieux visualiser le greffage du motif macrocyclique.

Cette expérience montre qu'il est possible de contrôler de manière relativement fine le taux de greffage de l'anticorps simplement en faisant varier le nombre d'équivalent de macrocycle. Les différents échantillons ont par la suite été engagés dans des tests d'agrégométrie à une concentration de 5 $\mu\text{g/mL}$ d'immunoconjugué (Figure III-24).

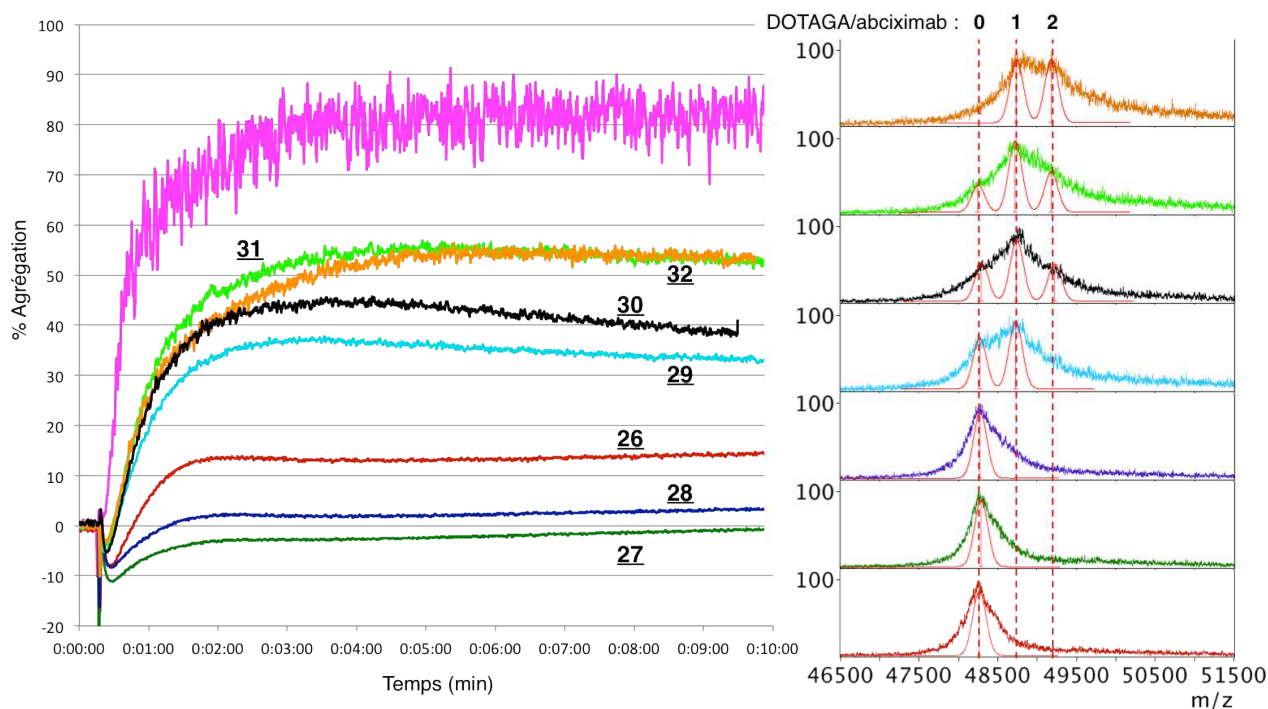


Figure III-24 : Corrélation entre les spectres de masse MALDI-TOF des composés **26** à **32** et la courbe d'agrégation correspondante. La courbe rose correspond à la courbe d'agrégation d'un PRP en présence d'ADP à 5 μ M : l'agrégation est "maximale".

Les courbes d'agrégation de l'abciximab **26** et des composés **27** et **28** restent aux alentours de 0 % d'agrégation, traduisant ainsi l'efficacité de ces immunoconjugués. Les composés **29** à **32** montrent quant à eux une perte d'activité croissante lorsque le nombre de macrocycles greffés augmente. On peut déduire de ces tests que le greffage d'un seul dérivé macrocyclique ciblant les résidus lysine suffit à inhiber l'activité antiagrégante de l'anticorps. Ces expériences se sont montrées reproductibles, et les mêmes activités biologiques ont été observées, confirmant les conclusions postulés précédemment.

Afin de mieux comprendre les raisons de la perte d'activité biologique de l'abciximab après greffage, nous avons décidé de reproduire le même type de greffage avec l'anhydride succinique. Cette petite molécule devrait nous permettre de déterminer si la perte d'activité provient d'un encombrement stérique du paratope dû au fragment macrocyclique, ou si le résidu lysine occupé joue un rôle crucial dans la liaison à l'antigène. Les immunoconjugués **33** à **37** ont donc été synthétisés de la même manière que précédemment en utilisant l'anhydride succinique en lieu et place du DOTAGA-anhydride (Schéma III-11).

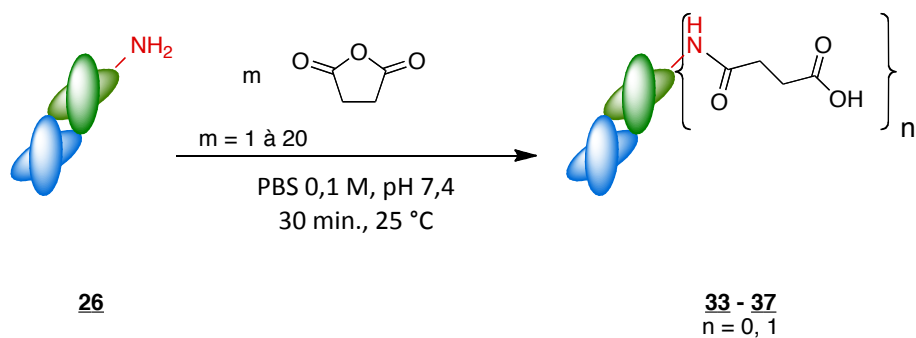


Schéma III-11

Les différents composés obtenus ont ensuite été analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF et leur activité biologique a été testée lors de tests d'agrégométrie (Figure III-25). L'analyse des données permet de conclure que l'addition d'un fragment acide succinique inhibe également l'activité antiagrégante de l'abciximab.

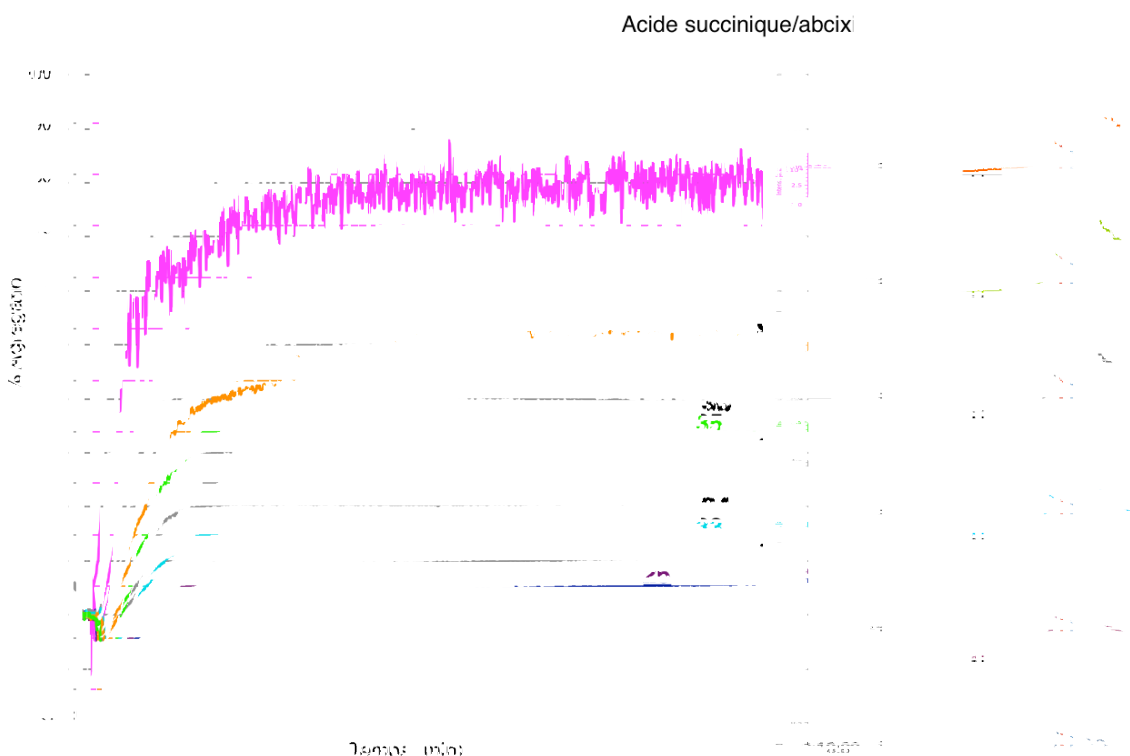


Figure III-25 : Corrélation entre les spectres de masse MALDI-TOF des composés **33** à **37** et la courbe d'agrégation correspondante. La courbe rose correspond à la courbe d'agrégation d'un PRP en présence d'ADP à 5 μ M : l'agrégation est "maximale".

Des études plus poussées de protéomique ont été réalisées sur la plateforme protéomique Clipp (Clinical and Innovation Proteomic Platform). L'analyse de la masse des différents fragments générés par digestion trypsique de la protéine nous ont permis de mettre en évidence deux sites de marquage préférentiels pour les composés **27** à **37**. En effet, la fonction anhydride cyclique du DOTAGA-anhydride comme de l'anhydride succinique, semble s'ouvrir de façon systématique sur

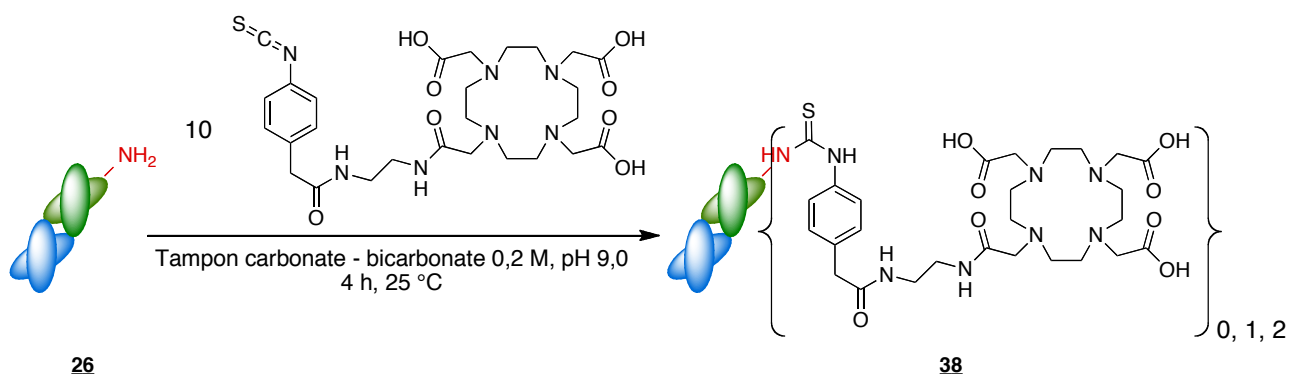
deux amines primaires spécifiques situées au niveau du paratope du Fab. L'une a pu être identifiée *a priori* comme la fonction N-terminale d'une des deux chaînes polypeptidique, tandis que la seconde n'a pas pu être identifiée, la séquence de l'anticorps n'ayant encore jamais été décrite à ce jour. Aux vues de ces résultats décevants, nous avons entrepris de réaliser le greffage d'agents chélatants bifonctionnels porteurs de fonctions de greffage autres que la fonction anhydride cyclique.

III.2.2.2 Greffage de dérivés du DOTA

Nous avons entrepris le greffage de l'abciximab par différents dérivés du DOTA porteurs d'une fonction isothiocyanate, succinimidyl, ou encore maléimide. Nous espérons ainsi cibler des fonctions amine primaire différentes, ou cibler des fonctions thiol.

III.2.2.2.1 Greffage du DOTA-NCS

Nous avons réalisé le greffage du DOTA-NCS synthétisé au laboratoire⁸⁴ en faisant réagir 10 équivalents de macrocycle avec l'abciximab dans un tampon carbonate-bicarbonate 0,2 M pendant 4 heures (Schéma III-12). On observe sur les spectres de masse la présence de trois pics correspondant aux anticorps modifiés par 0, 1 ou 2 macrocycles.



Nous avons profité de ces expériences pour optimiser les conditions expérimentales des tests d'agrégométrie. La concentration d'anticorps dans les expériences précédentes était fixée à $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, mais de nouveaux tests ont permis de déterminer une concentration limite d'activité de l'abciximab. Les courbes d'agrégation présentées dans la Figure III-26 mettent en évidence l'importance de la concentration en anticorps. Alors que le composé **38** semble montrer une bonne activité biologique à $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, on observe une perte d'activité à $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. L'abciximab de référence conserve quant à lui la même activité quelle que soit la concentration. Ces résultats suggèrent donc que l'inhibition de l'agrégation observée pour le composé **38** à $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ est

uniquement due à la fraction ne portant pas de motif macrocyclique. Comme lors du greffage du DOTAGA-anhydride, on observe une perte totale de l'activité antiagrégante des immunoconjugués.

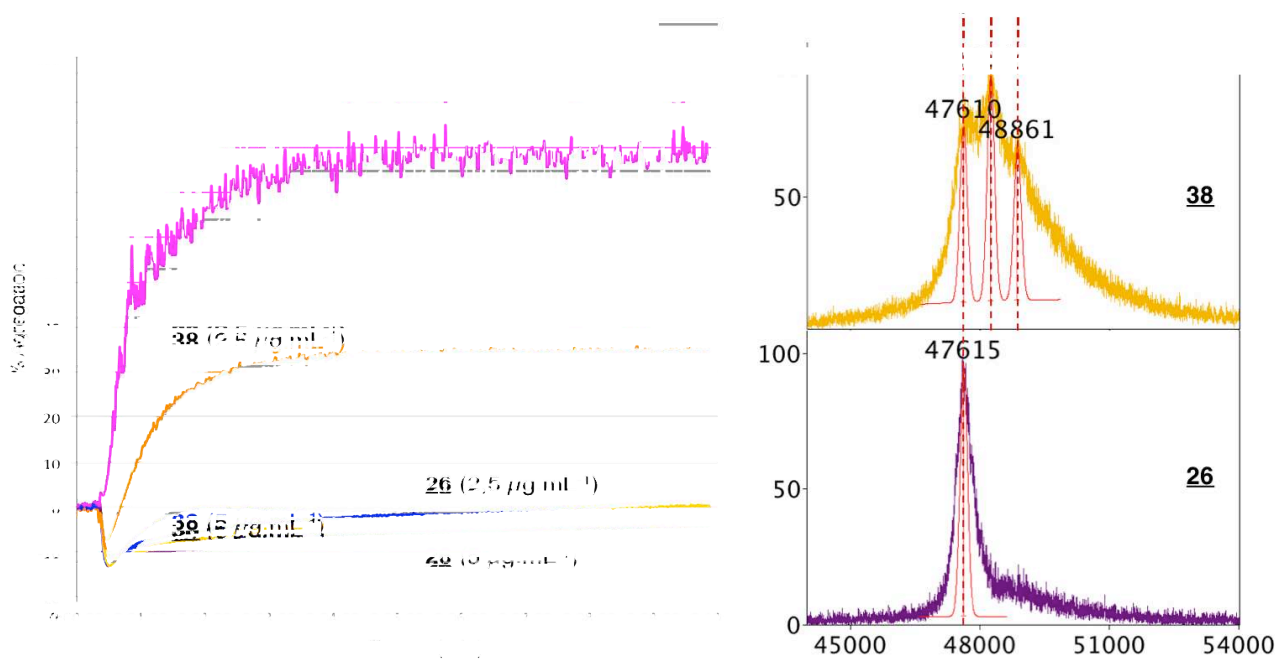


Figure III-26 : Corrélation entre les spectres de masse MALDI-TOF des composés **26** et **38** et la courbe d'agrégation correspondante. La courbe rose correspond à la courbe d'agrégation d'un PRP en présence d'ADP à 5 µM : l'agrégation est "maximale".

III.2.2.2.2 Greffage du DOTA-NHS

Toujours dans le but de cibler d'autres fonctions amine primaire, nous avons également réalisé le greffage de l'abciximab avec le DOTA-NHS, macrocycle commercial largement utilisé pour la bioconjugaison. Le couplage a été réalisé par addition de 10 ou 20 équivalents de DOTA-NHS à une solution d'abciximab **26** dans un tampon carbonate à pH 8,5 pendant 4 heures à 37 °C (Schéma III-13).

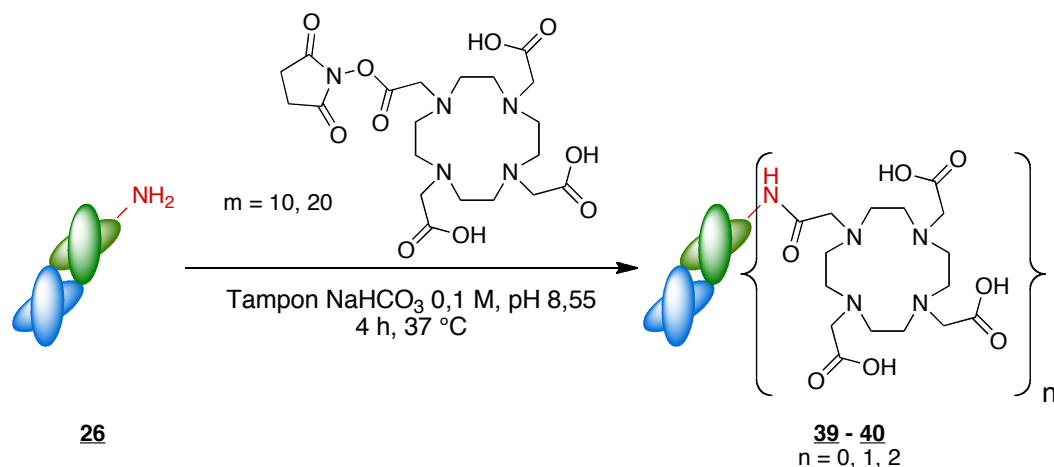


Schéma III-13

Le taux de greffage des composés **39** et **40** a ensuite été déterminé par spectrométrie de masse, montrant toujours différentes espèces portant 0, 1 ou 2 DOTA par Fab. L'activité biologique des composés a ensuite été déterminé par agrégométrie (Figure III-27).

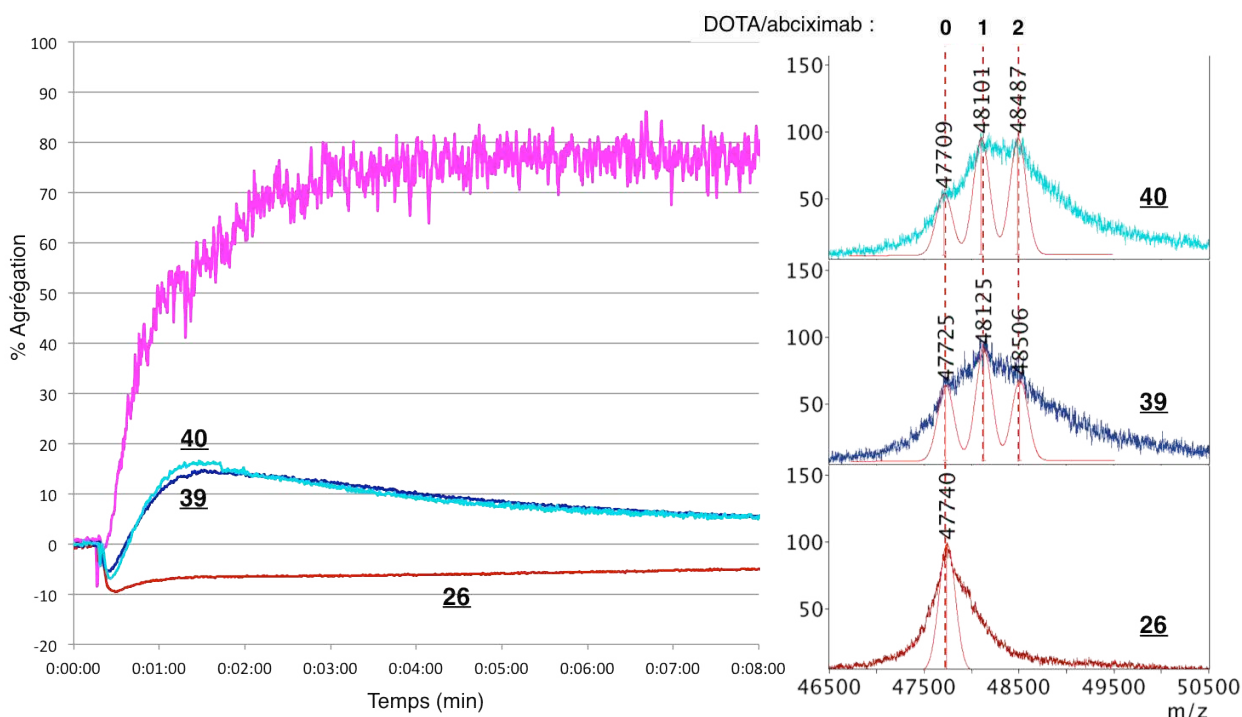


Figure III-27 : Corrélation entre les spectres de masse MALDI-TOF des composés **26**, **39**, et **40** et la courbe d'agrégation correspondante. La courbe rose correspond à la courbe d'agrégation d'un PRP en présence d'ADP à $5 \mu\text{M}$: l'agrégation est "maximale".

On note là encore une perte d'activité des immunoconjugués, moins importante néanmoins que lors du greffage des autres agents chélatants bifonctionnels, mais suffisante pour laisser supposer une inhibition de l'activité biologique de l'anticorps.

III.2.2.2.3 Greffage du DOTA-maléimide

En nous appuyant sur les données de la littérature,^{246,247} nous avons décidé de coupler le DOTA-maléimide commercial sur l'abciximab, après réduction sélective du pont disulfure intercaténaire de l'anticorps.

Nous avons donc réalisé la réduction sélective du pont disulfure intercaténaire de l'abciximab à l'aide de la tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) dans un tampon Tris-HCl en présence d'EDTA.²⁴⁷ Après purification et échange de tampon sur filtre centrifuge, les fragments d'abciximab **26'** ont été incubés 2 heures à 37 °C dans le PBS avec un large excès de DOTA-maléimide (Schéma III-14).

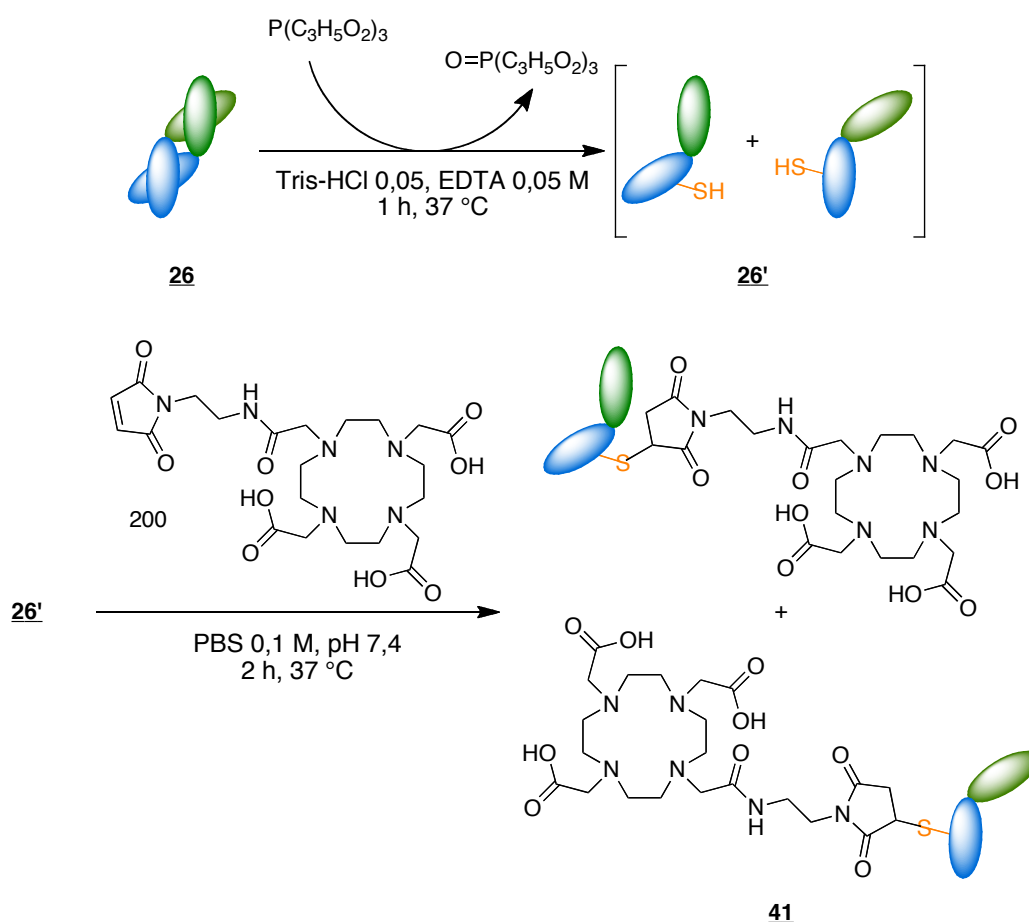


Schéma III-14

Les spectres de masse des composés **26**, **26'**, et **41** montrent clairement la réduction de l'abciximab, puis le greffage du DOTA-maléimide (Figure III-28).

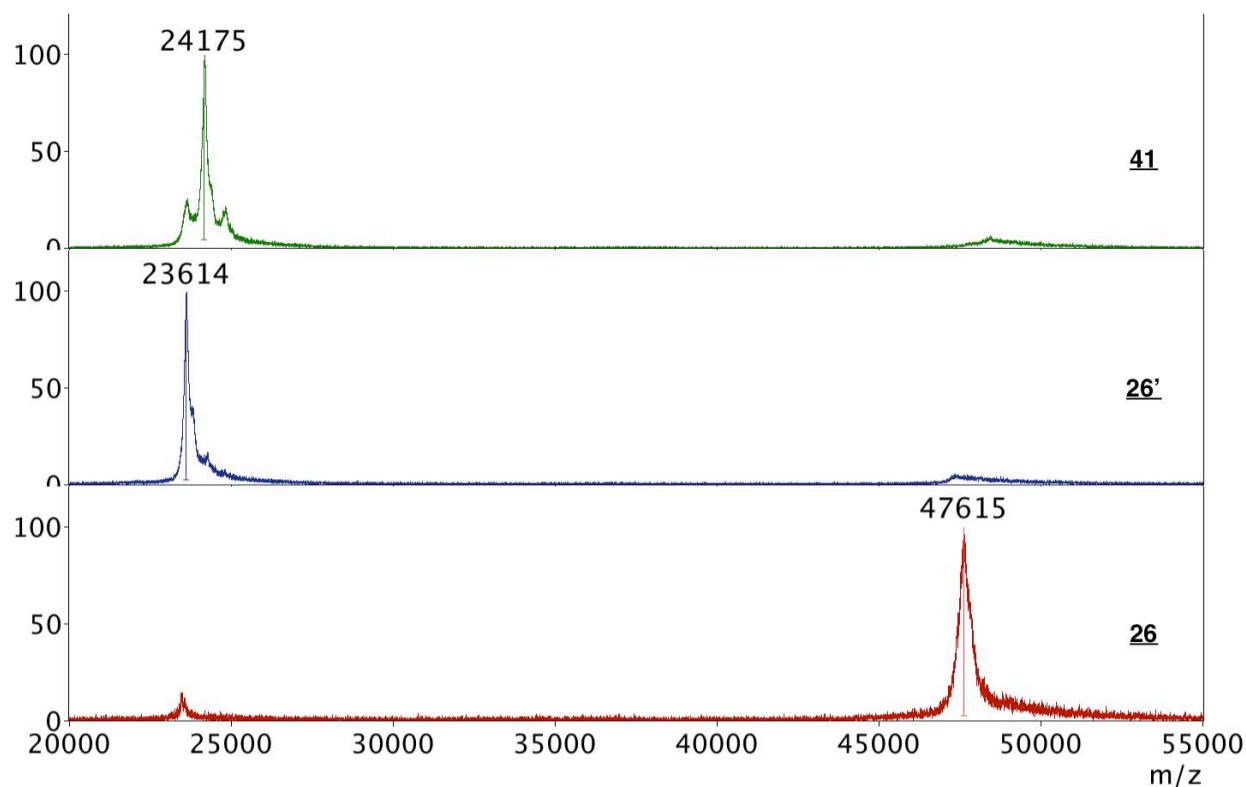


Figure III-28 : Spectres de masse MALDI-TOF des composés **26**, **26'** et **41**.

Malheureusement, les expériences d'agrégométrie se sont montrées décevantes, puisque l'on observe une perte totale de l'activité de l'anticorps (Figure III-21).

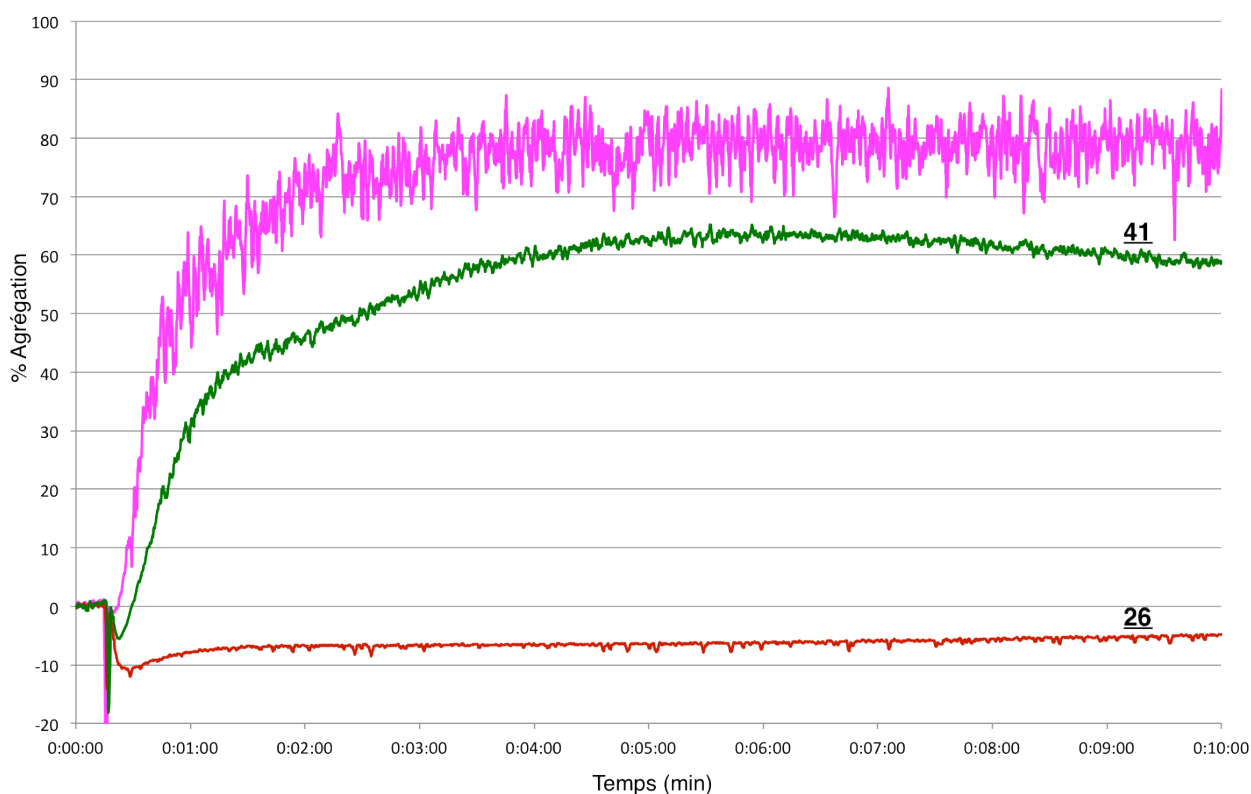


Figure III-29 : Courbes d'agrégation des composés **26** et **41**. La courbe rose correspond à la courbe d'agrégation d'un PRP en présence d'ADP à 5 μ M : l'agrégation est "maximale".

Ces résultats étaient néanmoins prévisibles, puisque le simple fait de réduire le pont disulfure intercaténaire de l'abciximab a pour conséquence de séparer les deux chaînes provoquant la perte de la structure spécifique du paratope.

III.2.3 Greffage multi-étape du DOTAGA-anhydride

Les nombreux échecs rencontrés soulignent toute la complexité d'une réaction de bioconjugaison sur un Fab. Concernant l'abciximab, il est désormais clair que les amines primaires les plus réactives interviennent directement dans la liaison de l'anticorps à son antigène. En partant de ce constat, une manière de s'affranchir de ce problème consiste à protéger les amines primaires les plus réactives avant de greffer l'agent chélatant bifonctionnel. La déprotection des amines primaires devraient ensuite permettre de retrouver les propriétés biologiques de l'anticorps.

Nous avons cherché à utiliser un groupement protecteur dont la réactivité est similaire à l'un des agents chélatant bifonctionnel utilisé précédemment. L'anhydride citraconique nous est alors apparu comme un groupement protecteur adéquat. En effet, de part sa nature d'anhydride cyclique, sa réactivité devrait être similaire à celle du DOTAGA-anhydride ou de l'anhydride succinique. De plus, les conditions de déprotection décrites dans la littérature sont douces, ce qui devrait donc éviter une dégradation de l'abciximab.^{59,250}

En nous basant sur nos travaux précédents (préparation des composés **27** à **37**), le composé **42** a été obtenu après incubation pendant 1 heure de l'abciximab avec 10 équivalents d'anhydride citraconique dans le PBS à 25 °C. La comparaison des spectres de masse MALDI-TOF des composés **26** et **42** nous a permis de déterminer un taux de greffage d'environ 4,9 groupements acide citraconique par Fab (Figure III-30).

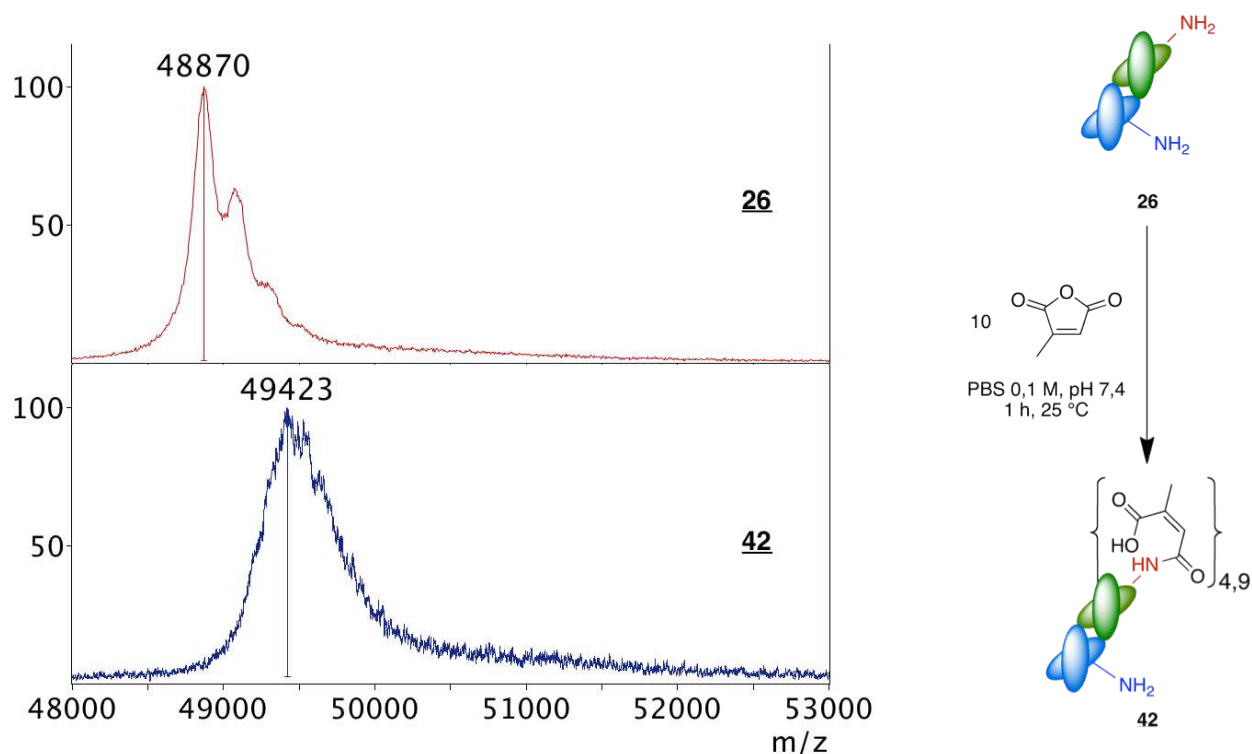


Figure III-30 : Spectres de masse MALDI-TOF des composés **26** et **42**, et schéma réactionnel permettant d'accéder au composé **42**.

Avant de réaliser le greffage de l'agent chélatant, nous avons tout d'abord tenté de déprotéger le composé **42** afin de vérifier si l'on régénèrait bien l'anticorps de départ. Le composé **42** a donc été incubé 3 heures à 35 °C dans un tampon acétate de sodium à pH 3,7. Après purification et échange de tampon, l'analyse du composé **43** par spectrométrie de masse confirme la déprotection de l'abciximab protégé (Figure III-31).

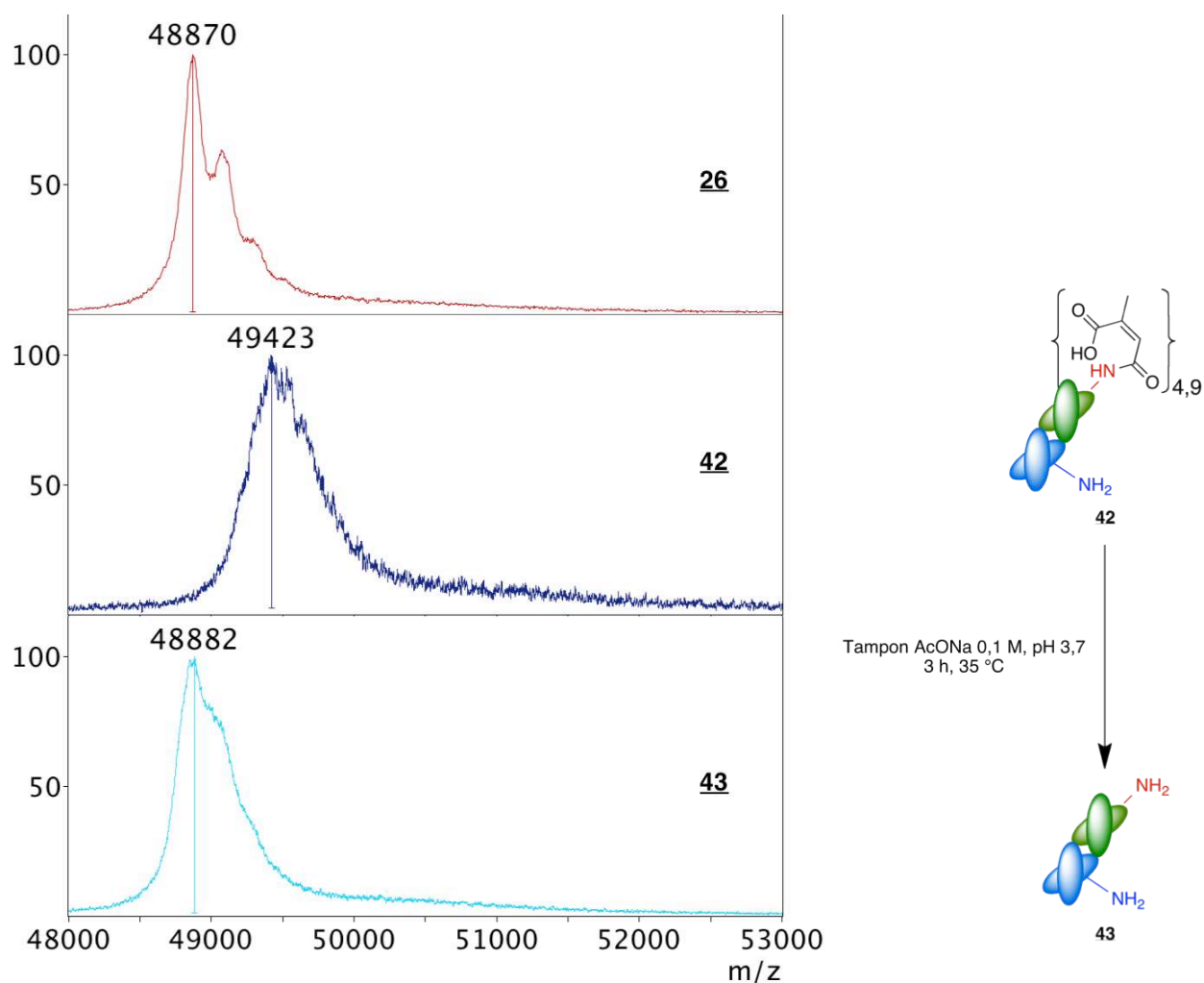


Figure III-31 : Spectres de masse MALDI-TOF des composés **26**, **42** et **43**, et schéma réactionnel permettant d'accéder au composé **43**.

Nous avons donc poursuivi l'expérience en incubant 20 équivalents du composé **2** avec l'abciximab protégé **42** dans les mêmes conditions que lors d'un greffage classique. Le spectre de masse obtenu après réaction confirme bien le greffage du DOTAGA, même si le taux de greffage d'environ 0,7 macrocycle par anticorps protégé reste modeste (Figure III-32).

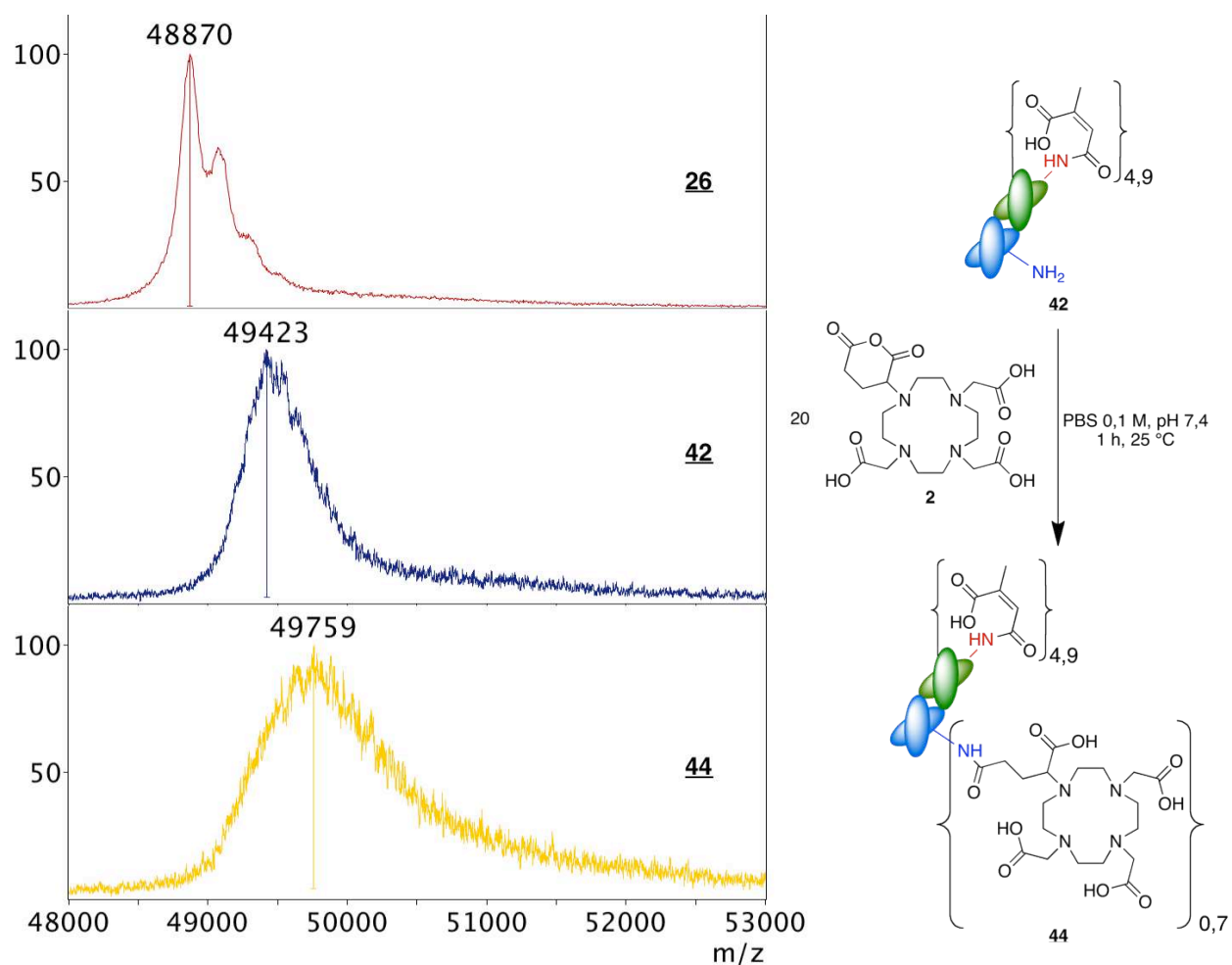


Figure III-32 : Spectres de masse MALDI-TOF des composés **26**, **42** et **44**, et schéma réactionnel permettant d'accéder au composé **44**.

Enfin, l'étape de déprotection du composé **44** a été réalisée dans des conditions similaires à celles utilisées pour le composé **43**. L'analyse du composé **45** par spectrométrie de masse nous a permis de confirmer la déprotection du composé **44**. Le taux de greffage du composé **45** a également pu être déterminé sans équivoque, puisque l'on observe un mélange d'anticorps portant 0, 1, voire 2 DOTAGA par abciximab (Figure III-33).

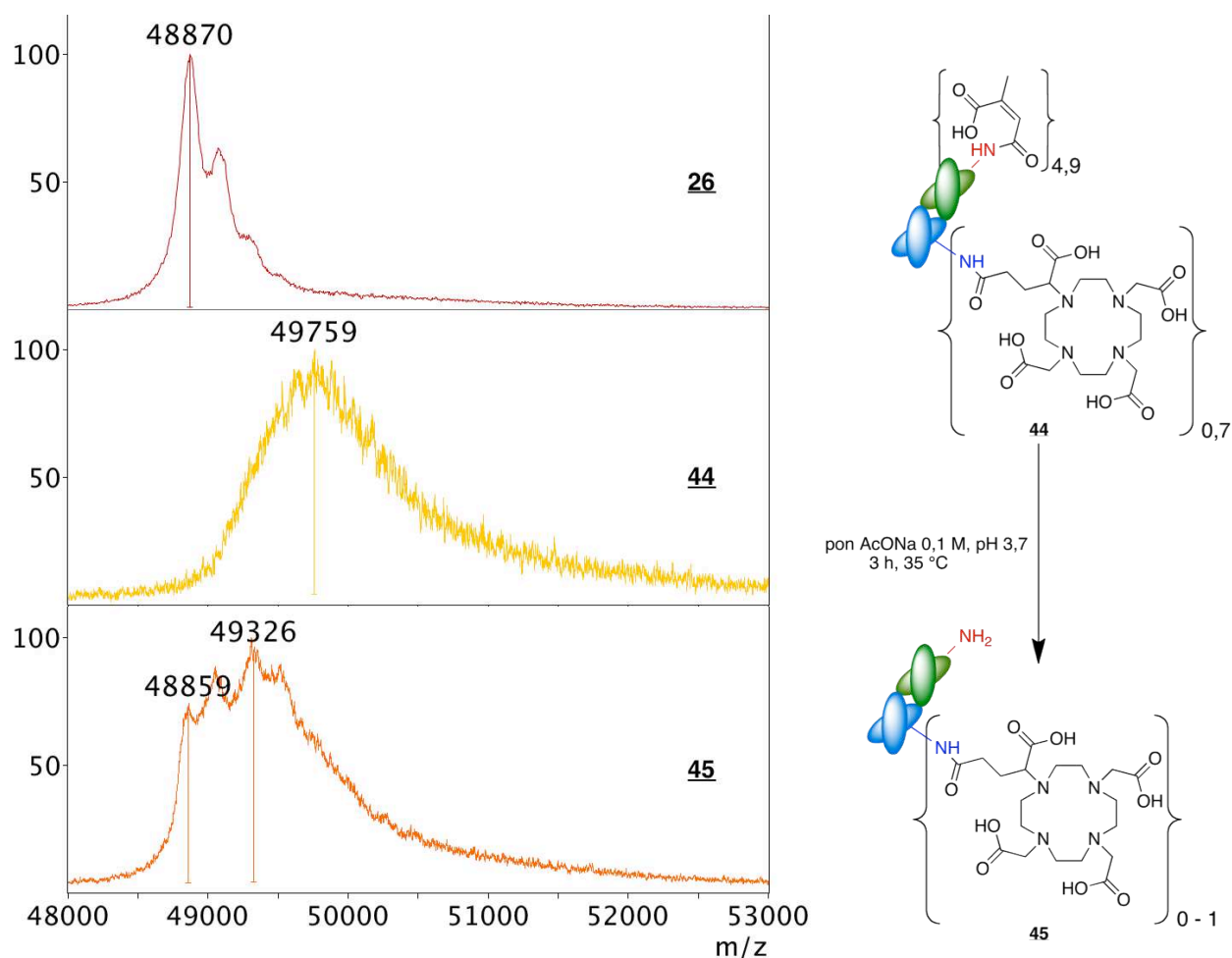


Figure III-33 : Spectres de masse MALDI-TOF des composés **26**, **44** et **45**, et schéma réactionnel permettant d'accéder au composé **45**.

Tous les produits et les intermédiaires réactionnels ont ensuite été analysés par agrégométrie (Figure III-34). Logiquement, on note une perte d'activité de l'anticorps lors de la protection par l'anhydride citraconique (composé **42**). La déprotection du composé **42** en **43** conduit, comme on pouvait l'espérer, à la récupération totale de l'activité de l'abciximab. Le greffage du macrocycle sur le composé **42** conduit quant à lui à une perte d'activité encore plus importante de l'immunoconjugué **44**. Enfin, l'étape cruciale de déprotection du composé **44** en **45** permet de retrouver l'activité antiagrégante de l'abciximab. Le procédé de greffage mis en œuvre nous a donc permis d'introduire un agent chélatant bifonctionnel sur l'abciximab tout en conservant l'activité biologique du Fab.

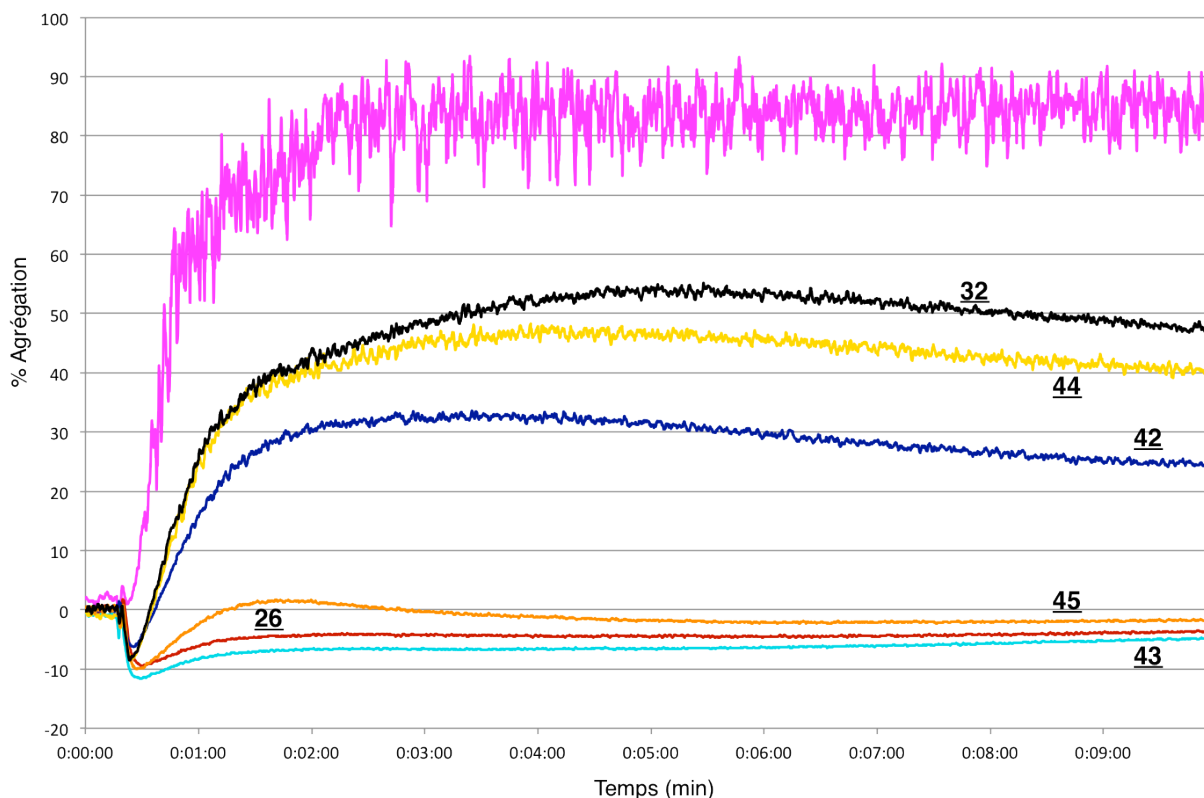
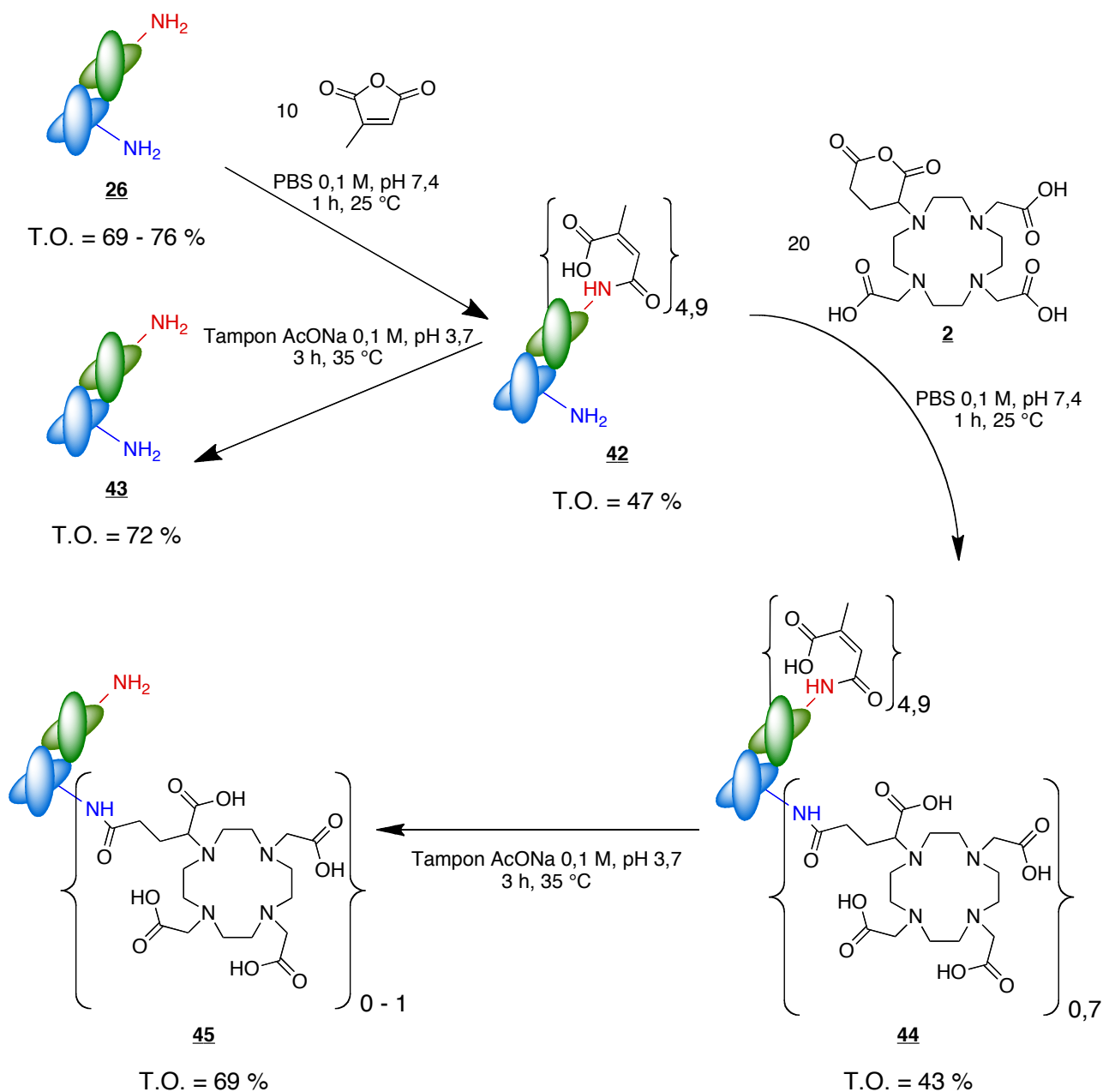


Figure III-34 : Courbes d'agrégation des composés **42** à **45**. La courbe d'agrégation du composé **32** est représentée à titre de comparaison. La courbe rose correspond à la courbe d'agrégation d'un PRP en présence d'ADP à $5 \mu\text{M}$: l'agrégation est "maximale".

Afin de confirmer ces résultats, nous avons cherché à déterminer le taux d'occupation des récepteurs GPIIb/IIIa d'un PRP après avoir été incubé avec les différents intermédiaires de synthèse **42** à **45**. Pour ce faire nous avons utilisé un kit Byocytex® "GPIIb/IIIa occupancy" qui contient deux anticorps monoclonaux anti-GPIIIa notés AcM1 (clone LYP18) et AcM2 (clone 4F8), un anticorps contrôle isotypique fluorescent ciblant AcM1 et AcM2, et des billes de calibration.^{251,252} L'anticorps monoclonal AcM1 permet de quantifier le nombre de sites GPIIb/IIIa libres (qui ne sont pas occupés par un autre anticorps), tandis que AcM2 sert à déterminer le nombre total de sites GPIIb/IIIa.

Les expériences ont ainsi été réalisées avec du PRP pré-incubé avec les différents composés **42** à **45** à une concentration de $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Les différents PRP ont ensuite été incubés d'une part avec AcM1 et d'autre part avec AcM2. L'ajout du contrôle isotypique fluorescent dans chaque échantillon a ensuite permis la détermination du nombre de sites GPIIb/IIIa libres et totaux par cytométrie en flux. Ces données ont ensuite permis de déterminer un taux d'occupation des récepteurs. Pour des raisons de clarté, les résultats sont regroupés dans la Figure III-35.



T.O. PRP seul = 11 %

T.O. : Taux d'occupation des sites GPIIb/IIIa

Figure III-35 : Taux d'occupation (T.O.) des récepteurs GPIIb/IIIa par les intermédiaires de synthèse **42** à **45**. Le taux d'occupation pour le PRP seul est d'environ 11 %.

La protection du composé **26** par l'anhydride citraconique conduit à une diminution significative du taux d'occupation (composé **42**), ce qui corrobore la perte d'activité observée en agrégométrie. L'augmentation du taux d'occupation lors de la déprotection du composé **42** en **43** peut également être reliée à la récupération de l'activité antiagrégante observée en agrégométrie. Le taux d'occupation diminue sensiblement après le greffage du synthon macrocyclique sur le composé **43** (composé **44**), confirmant encore une fois la perte d'activité de l'immunoconjugué observée précédemment. Enfin, la dernière étape de déprotection du composé **44** en **45** se traduit par une

augmentation du taux d'occupation des récepteurs GPIIb/IIIa corrélant également avec la récupération de l'activité observée en agrégométrie.

Ces résultats encourageants seront néanmoins à confirmer par des tests d'immunoréactivité sur des plaquettes purifiées après une étape de radiomarquage, avant de pouvoir envisager une évaluation *in vivo* de ce nouvel immunoconjugué.

III.3 Marquage de LPS : application à l'imagerie bimodale

Si les anticorps monoclonaux sont des vecteurs biologiques de choix pour le ciblage de tumeurs en imagerie TEMP, l'imagerie moléculaire peut également servir à mieux comprendre certains processus biologiques. Nous avons pu mettre en application ce principe dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire INSERM UMR866 "Lipides, Nutrition, Cancer". Ces travaux portants sur le marquage de lipopolysaccharides (LPS) ont été réalisés lors du stage post-doctoral du Dr. V. DUHERON et de la thèse de W. SALI.

III.3.1 Généralités concernant les LPS

Les lipopolysaccharides (LPS) (ou endotoxines) sont des composants majeurs de la membrane externe des bactéries Gram (-). Leur apparition dans la circulation sanguine conduit chez les mammifères, en particulier chez l'Homme, à la sécrétion massive de cytokines pro-inflammatoires. Une réponse contrôlée permet la destruction et l'élimination des bactéries pathogènes, notamment *via* l'intervention de la PLTP (*PhosphoLipid-Transfer Protein*).²⁵³⁻²⁵⁵ Cependant, une réponse inflammatoire excessive peut conduire à un débordement du système et à des défaillances circulatoire et respiratoire graves ; c'est le choc endotoxique ou choc septique qui constitue une composante redoutée de la phase aiguë de la septicémie. L'incidence mondiale de la septicémie est estimée à 18 millions de cas par an, et elle est amenée à augmenter avec le vieillissement de la population. Aucun traitement réellement efficace du choc endotoxique n'a été identifié à ce jour.

Les LPS sont des molécules complexes organisées en plusieurs domaines de structure variable selon les souches bactériennes (Figure III-36). Notons que l'activité pro-inflammatoire des LPS est uniquement induite par le domaine Lipide A, tandis que la longueur et la structure des autres domaines peuvent considérablement varier d'une souche bactérienne à une autre. Les LPS ont une masse moléculaire pouvant varier entre 2,5 et 20 kDa pour un seul monomère selon la souche bactérienne. Cependant, comme toute molécule amphiphile, ils ont une forte tendance à former des agrégats ou des micelles en milieu aqueux.

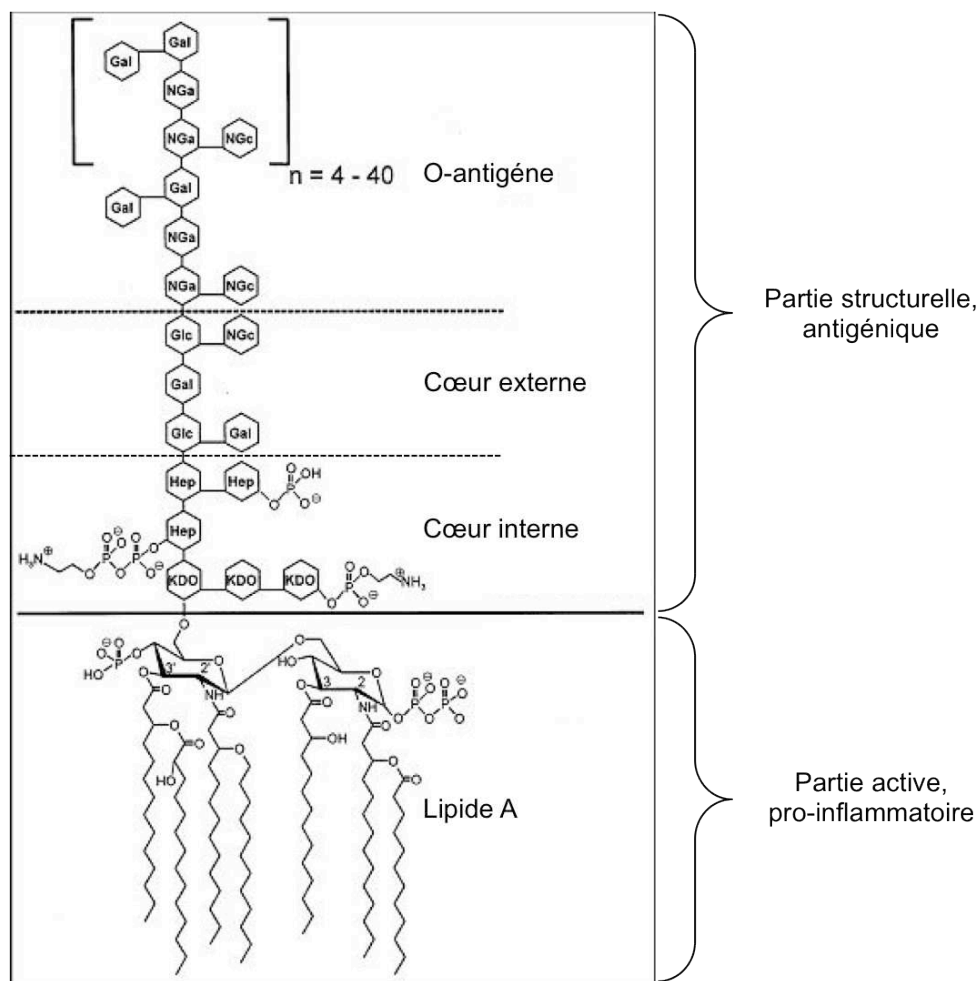


Figure III-36 : Structure générale d'un LPS.

De nombreux marquages de LPS ont été décrits dans la littérature, que ce soit pour une utilisation en imagerie par fluorescence *in vitro*,²⁵⁶⁻²⁵⁹ ou en imagerie scintigraphique *in vivo*.^{260,261} Néanmoins, aucune étude ne rapporte l'utilisation d'une molécule pouvant être utilisée à la fois en imagerie optique et en scintigraphie. Afin de mieux comprendre les processus mis en œuvre lors de l'élimination du LPS, nous nous proposons de marquer le LPS avec l'agent bimodal DOTA-Bodipy-NCS présenté dans le chapitre II. Ainsi, nous pourrions envisager un suivi de la biodistribution du LPS *in vivo* par TEMP, puis une analyse des tissus par microscopie à fluorescence.

III.3.2 Marquage de LPS par le système bimodal DOTA-Bodipy-NCS

On remarquera que la fonction de greffage utilisée ici est une fonction isothiocyanate, contrairement aux cas précédents où la fonction de greffage était une fonction anhydride cyclique. Nous nous appuyerons donc le protocole de greffage utilisé pour la synthèse du composé **38** (greffage du DOTA-NCS). Les LPS possèdent peu de fonctions amine primaire, mais sont en revanche très riches en fonctions hydroxyle, il est donc plus probable que l'agent multimodal forme une liaison thiocarbamate plutôt que thiourée. Le DOTA-Bodipy-NCS a été greffé avec succès sur

du LPS issu de *Escherichia Coli* (Schéma III-15) et le composé **46** a pu être isolé après purification par gel filtration (FPLC, Superdex[®] 75).

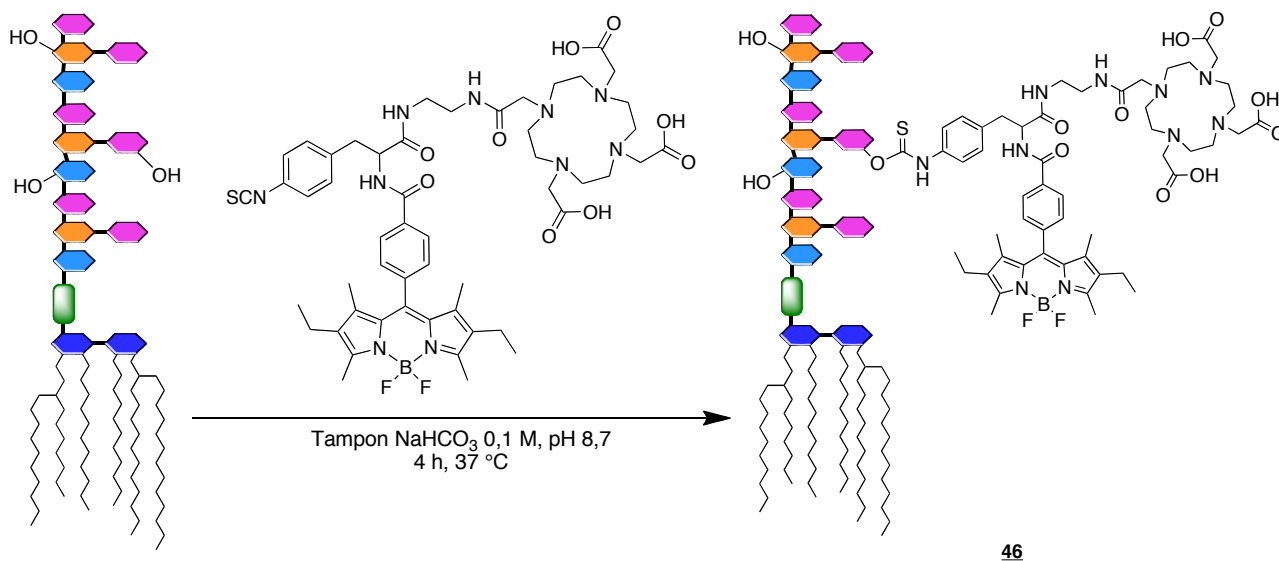


Schéma III-15

Malheureusement, aucun spectre de masse du composé entier ou d'un fragment identifiable n'a pu être obtenu malgré les nombreuses conditions expérimentales testées (changement de matrice, etc.). La tendance des LPS à former des agrégats ou des micelles pourrait rendre difficile leur ionisation et constituerait une explication plausible à cette mauvaise détection. Nous n'avons donc pas été en mesure de définir précisément le taux de greffage du DOTA-Bodipy-NCS sur le LPS. La présence de LPS dans les fractions collectées a été confirmée par dosage du β -hydroxymyristate, élément récurrent de la partie Lipide A. Les résultats obtenus montrent clairement la présence de LPS dans les fractions collectées (Figure III-37). Ce dosage nous a également permis de déterminer la concentration en LPS des solutions obtenues.

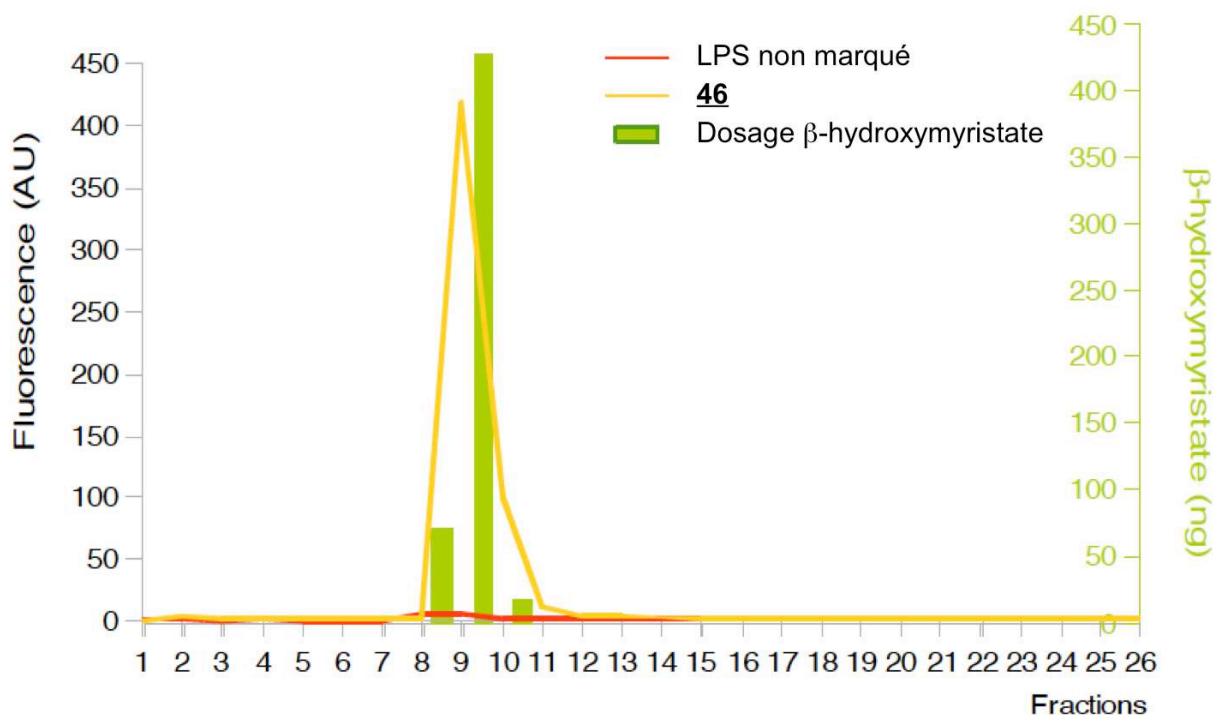


Figure III-37 : Émission de fluorescence et dosage β -hydroxymyristate des fractions récupérées après purification par FPLC du LPS non marqué et du composé **46**.

D'autres tests *in vitro* ont été réalisés afin de vérifier la conservation de l'activité pro-inflammatoire du LPS était conservée, et ont montré une activité du composé **46** similaire à celle observée pour le LPS non marqué.

Nous avons donc envisagé le radiomarquage du DOTA-Bodipy-LPS afin d'évaluer sa biodistribution *in vivo* chez la souris. Les LPS sont des molécules très résistantes et supportent aisément des températures pouvant atteindre 100 °C. Cette propriété nous a permis d'adapter les conditions de marquage, et nous avons donc décidé d'effectuer l'étape de radioméallation à 60 °C. Le ^{111}In -DOTA-Bodipy-LPS radiomarqué a ainsi été obtenu avec un rendement de radiomarquage de 60 %, nous permettant d'isoler le composé **47** après purification, avec une activité spécifique de 600 MBq.mg⁻¹ de LPS et une pureté radiochimique > 98 % (Schéma III-16).

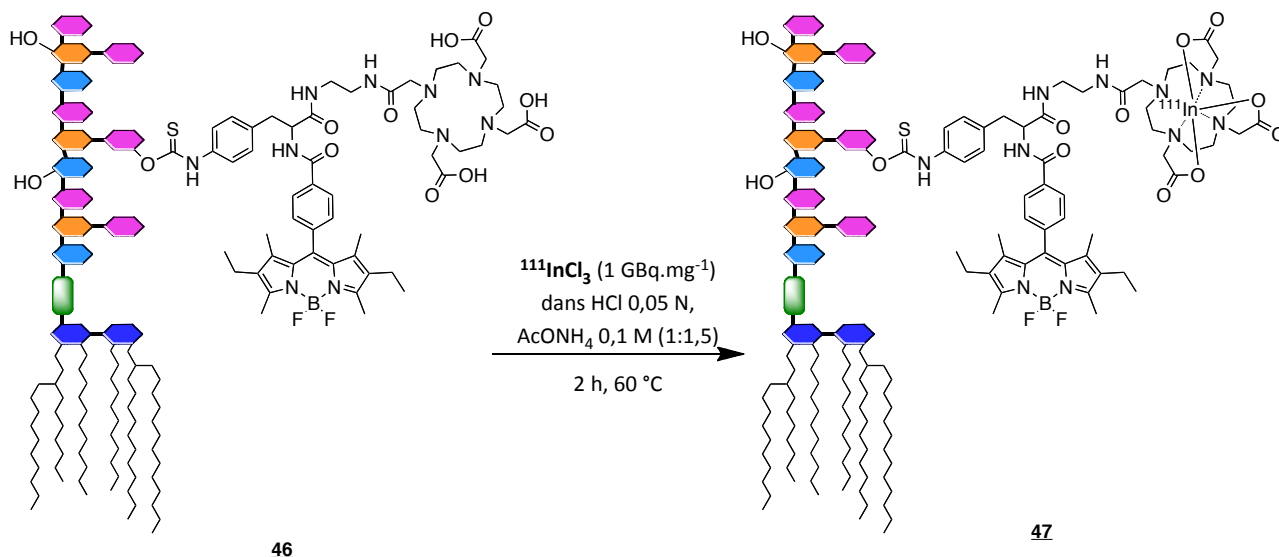


Schéma III-16

La biodistribution du ¹¹¹In-DOTA-Bodipy-LPS a été évaluée chez la souris C57 Black de type sauvage (C57BL/6J) par injection de 15 µg du composé **47** (100 µL, 9 MBq) dans la veine jugulaire. Une expérience de contrôle négatif a été réalisée par co-injection du composé **46** (15 µg) et d'indium-111 libre (100 µL, 9 MBq). Des projections tomographiques TEMP-TDM ont ensuite été enregistrées 30 minutes, 3 et 24 heures après l'injection (Figure III-38). Les images obtenues montrent une accumulation rapide du composé **47** dans le foie et la rate, tandis que l'expérience de contrôle montre une élimination directe de l'indium-111 dans la vessie.

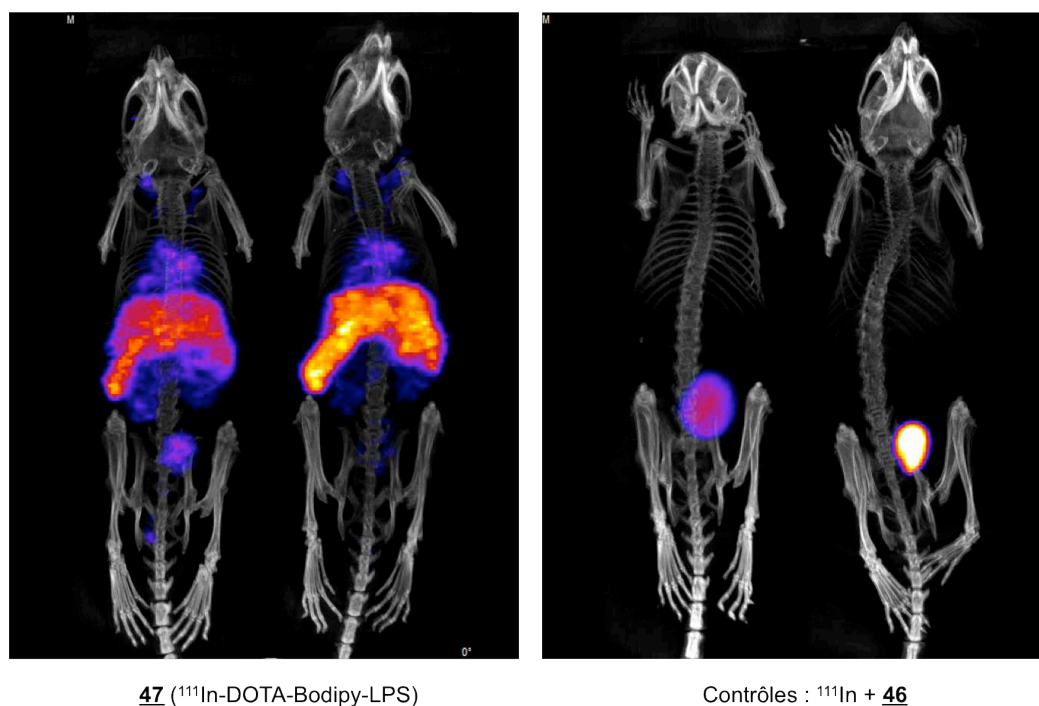


Figure III-38 : Images TEMP-TDM (MIP) de souris de type sauvage 30 minutes après injection du composé **47** (gauche) ou co-injection du composé **46** et d'indium-111 libre (contrôles, droite).

Après le dernier temps d'imagerie, les animaux ont été sacrifiés et la radioactivité dans le sang et les différents organes a été comptée. Les comptages confirment les résultats observés en TEMP, à savoir une localisation des LPS radiomarqués dans le foie et la rate, tandis que l'indium libre est éliminé par voie rénale.

Afin d'étudier la biodistribution au niveau cellulaire grâce à la partie Bodipy de l'agent multimodal, des échantillons de foie et de rate ont également été congelés en vue d'analyse par microscopie à fluorescence. Les coupes de foie de souris non injectées avec du LPS laissent apparaître un signal non spécifique sous forme de grosses particules auto-fluorescentes (Figure III-39). Malgré cette auto-fluorescence, il est possible d'identifier un signal spécifique du DOTA-Bodipy-LPS dans les coupes de foie des souris ayant reçu une injection du composé **47**. En effet, celui-ci apparaît sous forme d'un marquage punctiforme dans le cytoplasme des hépatocytes.

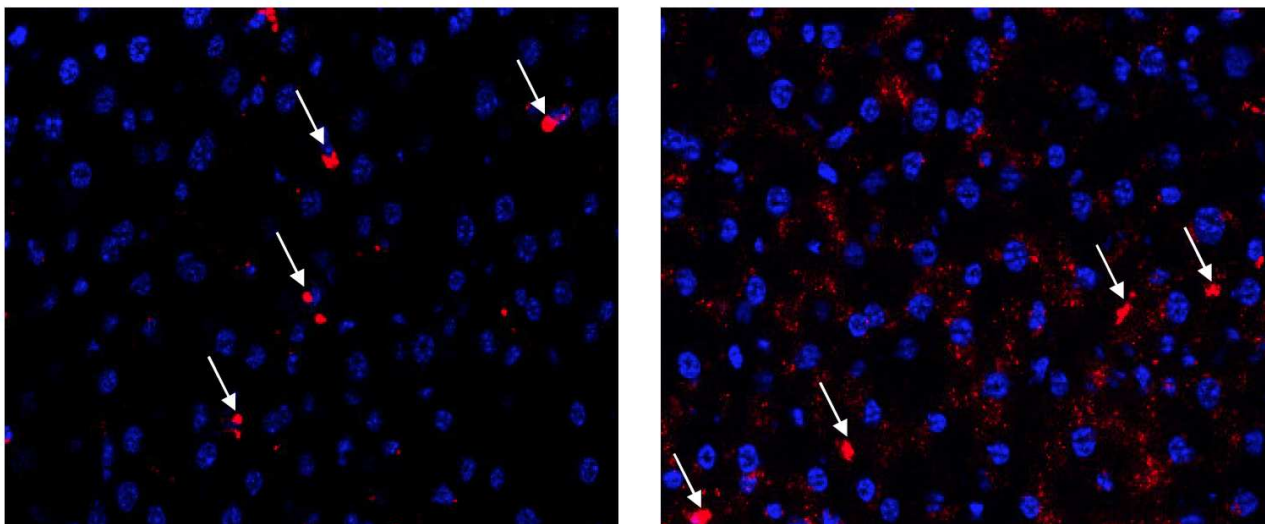


Figure III-39 : Images de microscopie à fluorescence des coupes de foie congelé de souris contrôles non injectées (gauche) et de souris ayant reçu une injection du composé **47** (droite). Les flèches blanches indiquent l'auto-fluorescence non spécifique, tandis que l'on observe un signal plus fin correspondant à la fluorescence du Bodipy dans le cytoplasme des hépatocytes.

Ces résultats encourageants démontrent l'utilité d'une double imagerie ciblée grâce à un marqueur multimodal monomoléculaire. En effet, à travers cette étude, nous avons pu mettre en évidence la complémentarité des informations apportées par les deux types d'imagerie utilisées. La TEMP nous a permis de suivre la biodistribution des LPS au cours du temps, tandis que l'imagerie optique a apporté des informations importantes sur le devenir cellulaire des LPS.

Ce système multimodal apporte indéniablement des informations complémentaires aux observations faites grâce à la TEMP, et nous envisageons donc son greffage sur les anticorps présentés précédemment. De nombreuses modifications pourront également être apportées à cette sonde imageante, que ce soit au niveau de la partie macrocyclique permettant la chélation d'autres

radiométaux, ou au niveau du Bodipy afin de décaler la longueur d'onde d'émission vers le proche infrarouge. Les systèmes DOTA-fluorescéine présentés dans le chapitre II sont également d'excellents candidats pour une utilisation en imageries TEMP et optique et pourront donc également être utilisés en tant que sondes multimodales.

III.4 Conclusion

La majeure partie de ce chapitre a été consacrée au marquage du trastuzumab et du cétuximab *via* l'utilisation de l'agent chélatant bifonctionnel DOTAGA-anhydride. Si les résultats de cette étude sont aujourd'hui satisfaisants, ils sont cependant le fruit de nombreuses étapes d'optimisation. Le greffage d'un nombre raisonnable d'unités DOTA a pu être réalisé dans des conditions douces et rapides, et la mise au point de techniques de caractérisation par spectrométrie de masse MALDI-TOF a permis une détermination fiable du taux de greffage des immunoconjugés préparés. L'optimisation des conditions de radioméallation nous a permis d'accéder à terme à des radioimmunoconjugés d'une grande pureté radiochimique tout en conservant une activité biologique intacte.

La préparation d'immunoconjugés à partir de l'abciximab a constitué un réel défi, du fait de la perte d'activité de l'anticorps après greffage direct. Ces premiers résultats nous ont alors poussé à développer une méthode de greffage non usuelle passant par des étapes de protection puis de déprotection des amines primaires les plus réactives de la protéine, ce qui nous a permis d'obtenir l'immunoconjugé désiré tout en conservant l'activité biologique du Fab. Ces résultats restent cependant à confirmer par des tests *in vitro* complémentaires.

Enfin, les premiers tests de bioconjugaison et de radiomarquage de LPS se sont avérés concluants et ont montré tous les bénéfices que pouvaient apporter une sonde multimodale dans la compréhension du métabolisme d'agents pathogènes. Ces systèmes seront prochainement mis en œuvre au laboratoire pour le marquage d'anticorps monoclonaux tels que le trastuzumab ou le cétuximab.

Conclusion générale

Ce travail de thèse était axé sur la mise au point de méthodes de marquage de biomolécules par des complexes de radiométaux à base de polyamines macrocycliques en vue d'une utilisation en imagerie médicale.

Dans un premier temps, nous avons réalisé la synthèse d'un nouvel agent chélatant bifonctionnel développé au laboratoire appelé DOTAGA-anhydride. Ce dérivé macrocyclique est à notre connaissance le seul dérivé du DOTA possédant une fonction de greffage anhydride cyclique et a ainsi pu être mis en œuvre dans des expériences de bioconjugaison.

La préparation de précurseurs de systèmes multimodaux "imagerie nucléaire/optique" a également été envisagée en intégrant un fluorophore de type fluorescéine et une entité DOTA dans une seule molécule. L'utilisation d'un dérivé de la lysine en tant que "plateforme" nous a permis d'y attacher les différents "blocs" par couplage peptidique. Une fonction de greffage adéquate pourra ensuite être ajoutée sur les différents précurseurs synthétisés afin d'engager la sonde multimodale dans une réaction de bioconjugaison.

La facilité d'utilisation du DOTAGA-anhydride a permis l'introduction aisée et contrôlée d'unités DOTA sur deux anticorps monoclonaux utilisés en oncologie. Une méthode de contrôle du taux de greffage par spectrométrie de masse MALDI-TOF a également été mise en œuvre. Le trastuzumab et le cétuximab ont ainsi pu être radiomarqués à l'indium-111 avec des rendements de radiomarquage satisfaisants et une grande pureté radiochimique. L'activité biologique de chaque radioimmunoconjugué a pu être validée par des expériences de saturation *in vitro*. L'inertie des étapes de greffage et de radiomarquage sur l'activité des deux anticorps a finalement été vérifiée par des études sur le petit animal. Les images TEMP de souris immunodéficientes porteuses de tumeurs obtenues attestent de la spécificité de chaque anticorps radiomarqué pour leur cible. Des études comparatives sont actuellement menées pour évaluer la biodistribution de dérivés Fab et (Fab)₂ du cétuximab.

La méthode de bioconjugaison du DOTAGA-anhydride a par la suite été transposée au greffage sur un fragment d'anticorps de type Fab. Cette modification conduisant à une perte de l'activité biologique de l'abciximab, nous avons tout d'abord cherché à comprendre la raison de cet échec. Des analyses de protéomique ont permis de mettre en évidence un greffage préférentiel sur les amines primaires qui semblent situées au niveau de site de liaison à l'antigène. Cette constatation nous a dans un premier temps poussé à envisager le greffage de dérivés macrocycliques porteurs de fonctions de greffage différentes. Cette méthode ne conduisant pas non plus aux résultats attendus, nous avons finalement mis au point une méthode de greffage multi étapes nous permettant d'accéder *in fine* à un dérivé DOTAGA-abciximab dont l'activité biologique est préservée.

L'étude de la biodistribution de LPS par TEMP et imagerie optique a permis la valorisation d'un système multimodal DOTA-Bodipy-NCS précédemment synthétisé au laboratoire. Le greffage de ce composé monomoléculaire a été validé par des méthodes originales (dosage β -hydroxymyristate, FPLC), et les méthodes de radiomarquages mises au point précédemment ont pu être transposées pour le marquage du DOTA-Bodipy-LPS. Les images de TEMP-TDM et de

microscopie à fluorescence obtenues nous permettent donc de valider le concept de l'association d'un fragment Bodipy et d'un polyazamacrocyclo.

Malgré les nombreux progrès technologiques de ces dernières années, l'imagerie médicale a encore beaucoup à offrir et n'a de cesse d'évoluer (développement de nouvelles caméras TEMP ou TEP, de nouveaux imageurs à fluorescence, etc.). La tendance à traiter les différentes pathologies au cas par cas incite la communauté scientifique à se tourner de plus en plus vers la conception de sondes imageantes vectorisées, que ce soit pour le diagnostic ou le suivi thérapeutique. Les sondes imageantes de demain devront également composer avec la multimodalité (TEP-IRM, TEMP-Optique, etc.). Mais l'un des prochains grands défis réside dans la conception d'agents encore plus performants capables d'intégrer une ou deux modalités d'imagerie, ainsi qu'un agent thérapeutique : les agents dits "théranostiques".

Partie expérimentale

INSTRUMENTATION

NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY

NMR spectra were recorded on a Bruker 300, 500 or 600 spectrometer (300 MHz, 500 MHz or 600 MHz for ^1H ; 75 MHz, 125 MHz or 150 MHz for ^{13}C). All chemical shifts were referenced to the solvent peak. The following abbreviations are used; s: singlet, d: doublet, t: triplet, q: quartet, m: multiplet, b: broad.

MASS SPECTROMETRY

Mass spectra were obtained by MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight) with a Bruker DALTONICS Ultraflex II spectrometer.

Electrospray mass measurements were carried out using a Bruker microTOF-QTM ESI-TOF (ElectroSpray Ionization - Time Of Flight) mass spectrometer.

ELEMENTAL ANALYSIS

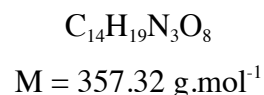
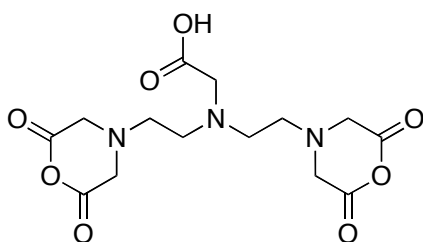
Elemental analyses were performed with a Fisons EA CHNS instrument.

UV-VISIBLE SPECTROSCOPY

Absorption spectra for determination of the protein concentration of the solutions were recorded on a JASCO Bio-spectrophotometer UV-Vis V-630Bio.

SYNTHÈSE D'AGENTS CHÉLATANTS BIFONCTIONNELS À BASE DE POLYAMINES MACROCYCLIQUES

1 2-(bis(2-(2,6-dioxomorpholino)ethyl)amino)acetic acid or "DTPA-dianhydride"

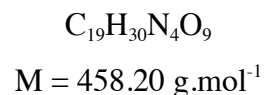
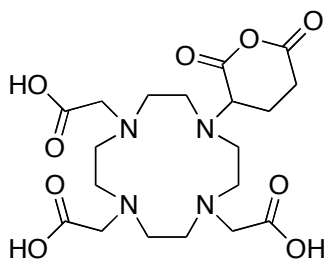


1 mL of acetic anhydride was added to a suspension of DTPA (500 mg, 1.3 mmol) in pyridine (630 μL , 7.8 mmol, 6 equiv.) under nitrogen. The mixture was stirred at 65 °C for 24 h, and then at room temperature for 30 min. The suspension was filtered, washed with acetic anhydride (5 mL), acetonitrile (10 mL) and finally diethylether (20 mL). The solid was dried under vacuum to afford 1 as a white grey solid (m = 450 mg, yield = 97 %).

^1H NMR (600 MHz, DMSO, 298 K) δ (ppm): 3.71 (s, 8H), 3.31 (s, 2H), 2.75 (t, 4H, $^3J = 5.8$ Hz), 2.60 (t, 4H, $^3J = 5.8$ Hz).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (75 MHz, DMSO) δ (ppm): 171.9 (C=O), 165.8 (*4) (C=O), 54.5, 52.6 (*4), 51.8 (*2), 50.7 (*2).

2 2,2',2''-(10-(2,6-dioxotetrahydro-2H-pyran-3-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid or "DOTAGA-anhydride"

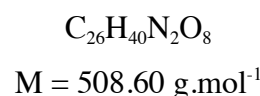
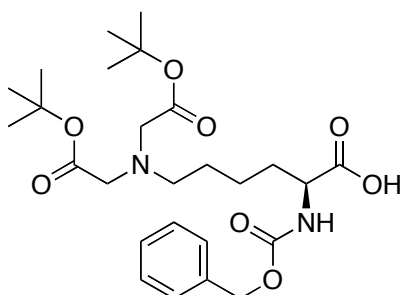


2 mL of acetic anhydride were added to a suspension of DOTAGA, 2 HCl (1 g, 1.8 mmol) in pyridine (850 μL , 11 mmol, 6 equiv.) under nitrogen. The mixture was stirred at 65 °C for 24 h, and then at room temperature for 30 min. The suspension was filtered, washed with acetic anhydride (10

mL), acetonitrile (20 mL) and finally diethylether (30 mL). The solid was dried under vacuum to afford **2** as a white grey solid (m = 950 mg, yield = 96 %).

ESI-MS: $m/z = 481.19 [M+Na]^+$.

3 *Nε-(Di-tert-butylacetate)-Nα-(carbobenzyloxy)-L-lysine*



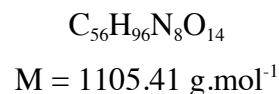
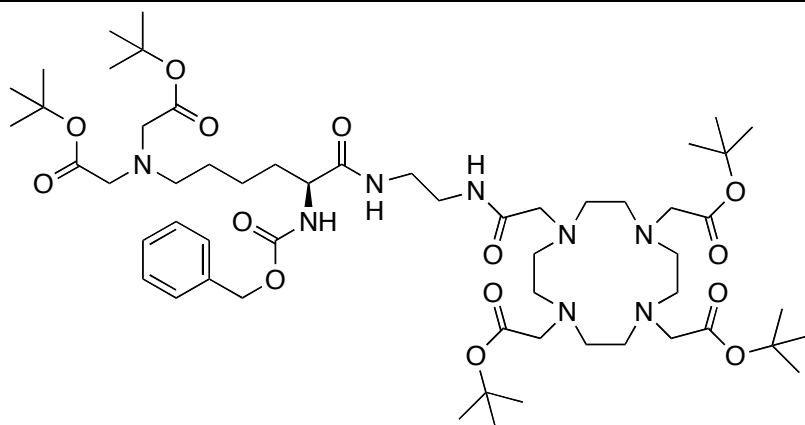
To a solution of *Nα*-(carbobenzyloxy)-L-lysine (10 g, 35.7 mmol) in a CH_3CN/H_2O mixture (50:50, 200 mL), was added 29.5 mL of DIPEA (178 mmol, 5 equiv.) followed by 10.5 mL of *tert*-Butyl bromoacetate (71.3 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred overnight at 40 °C. Acetonitrile was evaporated and the pH of the aqueous layer was adjusted to 1.5 by addition of 300 mL 5 % citric acid solution. The white sticky precipitate was extracted with chloroform (3 × 300 mL). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. The product was dissolved in 300 mL of diethylether, and the precipitate was discarded by filtration. The filtrate was concentrated under vacuum and the resulting oil was chromatographed on silica gel with heptane/AcOEt (50:50 to 0:100). After concentration of the combined pure fractions, the compound **3** was obtained as a colorless oil (m = 11.45 g, 22.5 mmol, yield = 63 %).

1H NMR (300 MHz, DMSO, 298 K) δ (ppm): 12.51 (bs, 1H), 7.51 (d, 1H), 7.35 (m, 5H), 5.03 (s, 2H), 3.91 (m, 1H), 3.32 (s, 4H), 2.56 (m, 2H), 1.62 (m, 2H), 1.40 (s, 18H), 1.33 (m, 4H).

$^{13}C\{^1H\}$ NMR (75 MHz, DMSO) δ (ppm): 173.9 (COOH), 170.1 (*2) (C=O), 156.1 (C=O), 137.0 (arom), 128.3 (*2) (arom), 127.7 (arom), 127.6 (*2) (arom), 80.0 (*2) (C tBu), 65.3, 55.4 (*2), 53.8, 53.1, 30.7, 27.8 (*6) (CH_3 tBu), 26.8, 23.2.

ESI-MS: $m/z = 531.28 [M+Na]^+$, 553.26 $[M-H+2 Na]^+$.

4 *Nε-(Di-tert-butylacetate)-Nα-(carbobenzyloxy)-L-lysine-N-(aminocarbonyl)ethanamido-DO3AtBu*



290 mg of **3** (0.57 mmol) was mixed with DO3AtBu-*N*-(2-aminoethyl)ethanamide (390 mg, 0.63 mmol, 1.1 equiv.), HBTU (220 mg, 0.57 mmol, 1 equiv.), HOBt (80 mg, 0.57 mmol, 1 equiv.) DIEA (198 μL , 1.20 mmol, 2.1 equiv.) in 10 mL of CH_2Cl_2 . The mixture was stirred overnight at room temperature. The solvent was then evaporated under vacuum, and the product was dissolved in a mixture of CH_3CN (10 mL) and 5% NaHCO_3 aqueous solution (10 mL). CH_3CN was evaporated under vacuum and the aqueous phase was extracted with 10 mL of pentane. The organic layer was discarded, and the aqueous layer was finally extracted with AcOEt (2×10 mL). The combined organic layers were then washed with 5 % NaHCO_3 (10 mL), diluted citric acid solution adjusted to pH 2.8 (2×10 mL), and water (10 mL). The organic layer was dried over MgSO_4 , and the solvent was evaporated. The product was taken in diethylether, and the precipitate was filtered off using a 0.2 μm filter. After evaporation of the filtrate, the compound **4** (+ HPF_6 coming from HBTU) was obtained as a white foam ($m = 580$ mg, 0.46 mmol, yield = 81 %).

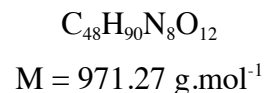
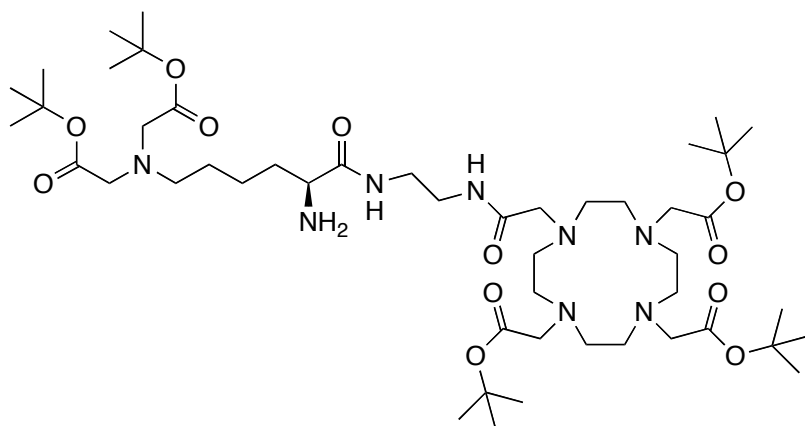
^1H NMR (600 MHz, DMSO, 323 K) δ (ppm): 7.95 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.41-7.26 (m, 5H), 7.17 (s, 1H), 5.02 (m, 2H), 3.93 (m, 1H), 3.32 (s, 4H), 3.20 (s, 4H), 3.18-2.93 (m, 10H), 2.78-2.53 (m, 8H), 2.46-2.07 (m, 8H), 1.62 (m, 1H), 1.52 (m, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.43 (s, 18H), 1.41 (s, 18H), 1.37-1.19 (m, 4H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, DMSO, 323 K) δ (ppm): 173.0 (C=O), 172.6 (*2) (C=O), 172.5 (C=O), 172.1 (C=O), 170.5 (*2) (C=O), 156.4 (C=O), 137.5 (arom), 128.7 (*2) (arom), 128.2 (arom), 128.0 (*2) (arom), 81.6 (C tBu), 81.5 (*2) (C tBu), 80.5 (*2) (C tBu), 65.9, 56.5, 56.1 (*2), 56.0, 55.9 (*2), 55.3, 53.9, 50.5 (*8), 39.1, 38.5, 32.4, 28.3 (*6) (CH_3 tBu), 28.1 (*6) (CH_3 tBu), 28.1 (*3) (CH_3 tBu), 27.5, 23.6.

ESI-MS: $m/z = 1127.70$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

Elemental analysis for $\text{C}_{56}\text{H}_{96}\text{N}_8\text{O}_{14} \cdot \text{HPF}_6 \cdot 0.5 \text{H}_2\text{O}$:

- Calculated: C (51.88 %), H (7.93 %), N (8.79 %)
- Found: C (51.83 %), H (8.11 %), N (8.91 %)

5 *Nε-(Di-tert-butylacetate)-L-lysine-N-(aminocarbonyl)ethanamido-DO3AtBu*

520 mg of **4** (0.41 mmol) were placed in 5 mL of methanol with 17 mg of 10 % Pd/C (16 μmol , 0.04 equiv) under H_2 . After consumption of 9.2 mL of hydrogen (0.41 mmol, 1 equiv.), the catalyst was removed by filtration on Clarcel[®] and the solvent was evaporated under vacuum. The compound **5** (+ HPF₆) was obtained as a white foam (m = 430 mg, 0.38 mmol, yield = 93 %).

¹H NMR (600 MHz, DMSO, 363 K) δ (ppm): 7.90 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 3.32 (s, 4H), 3.25-3.17 (m, 4H), 3.15 (s, 3H), 3.13 (bs, 4H), 3.05 (s, 2H), 2.78-2.52 (m, 10H), 2.33 (bs, 10H), 1.61 (m, 1H), 1.47 (s, 9H), 1.45 (s, 18H), 1.43 (s, 18H), 1.41-1.26 (m, 5H).

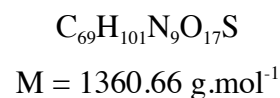
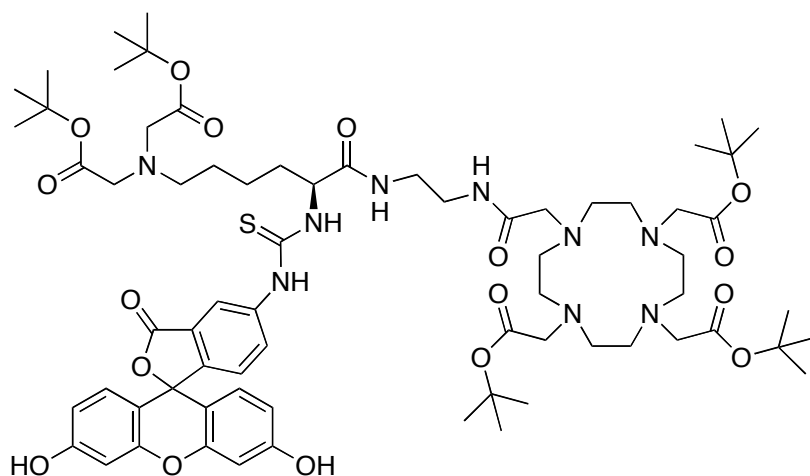
¹³C{¹H} NMR (150 MHz, DMSO, 363 K) δ (ppm): 174.5 (C=O), 172.0 (C=O), 171.6 (*2) (C=O), 171.3 (C=O), 169.6 (*2) (C=O), 80.8 (C tBu), 80.7 (*2) (C tBu), 79.6 (*2) (C tBu), 55.8, 55.4 (*2), 55.3, 55.2 (*2), 54.4, 53.4, 49.9 (*8), 38.4, 37.6, 34.3, 27.4 (*6) (CH₃ tBu), 27.3 (*6) (CH₃ tBu), 27.2 (*3) (CH₃ tBu), 27.0, 22.5.

ESI-MS: m/z = 993.65 [M+Na]⁺, 508.32 [M+2 Na]²⁺, 497.33 [M+H+Na]²⁺.

Elemental analysis for C₄₈H₉₀N₈O₁₂ · 6 HPF₆ · 3.5 H₂O:

- Calculated: C (48.84 %), H (8.37 %), N (9.49 %)
- Found: C (48.82 %), H (8.42 %), N (9.64 %)

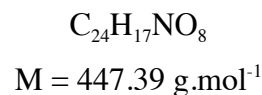
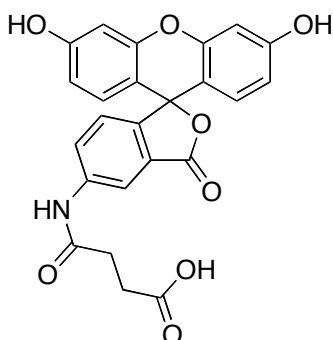
6 *Nε-(Di-tert-butylacetate)-Nα-(fluorescein-5-thiourea)-L-lysine-N-(aminocarbonyl)ethanamido-DO3AtBu*



100 mg of **5** (100 μmol) was mixed with fluorescein isothiocyanate (48 mg, 120 μmol , 1.2 equiv.), in 2 mL of DMF. The mixture was stirred overnight in the dark at room temperature. The product was concentrated under vacuum and the resulting oil was chromatographed on silica gel with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (100:0 to 80:20). After concentration of the combined pure fractions, the compound **6** was obtained as a yellow powder ($m = 50 \text{ mg}$, 33.1 μmol , yield = 33 %).

^1H NMR (600 MHz, DMSO, 383 K) δ (ppm): 10.13 (bs, 1H), 9.73 (bs, 2H), 8.42 (s, 1H), 8.09 (bs, 1H), 7.89 (bs, 1H), 7.87 (d, 1H, $^3J = 8.3 \text{ Hz}$), 7.77 (s, 1H), 7.13 (d, 1H, $^3J = 8.3 \text{ Hz}$), 6.70 (m, 2H), 6.61 (m, 2H), 6.57 (m, 2H), 4.90 (m, 1H), 3.34 (s, 4H), 3.26 (m, 4H), 3.19 (s, 2H), 3.16 (s, 4H), 2.93 (bs, 18H), 2.67 (m, 2H), 1.86 (m, 1H), 1.75 (m, 1H), 1.51-1.38 (m, 49H).

7 *Fluorescein-5-aminocarbonyl ethanoic acid*



To a solution of 5-aminofluorescein (1 g, 2.88 mmol) in a AcOH/dioxane mixture (50:50, 200 mL) was added 290 mg of succinic anhydride (2.88 mmol, 1 equiv.). The mixture was stirred overnight in the dark at room temperature. Solvents were evaporated to dryness, and the orange

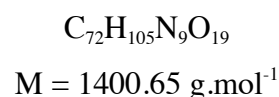
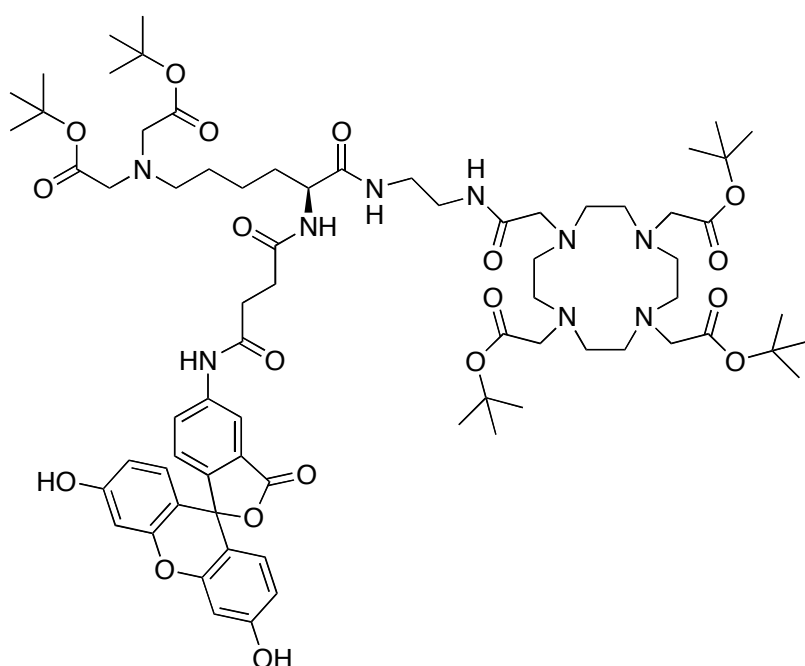
solid was suspended in 100 mL of water and stirred for 30 minutes. The solid was collected by filtration, washed with 20 mL of water, and dried under high vacuum to give the compound **7** as an orange powder ($m = 1.05$ g, 2.35 mmol, yield = 81 %).

^1H NMR (300 MHz, DMSO, 298 K) δ (ppm): 12.00 (bs, 1H), 10.43 (s, 1H), 10.14 (bs, 2H), 8.31 (s, 1H), 7.82 (d, 1H, $^3J = 8.4$ Hz), 7.20 (d, 1H, $^3J = 8.4$ Hz), 6.61 (m, 6H), 2.61 (m, 4H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (75 MHz, DMSO, 298 K) δ (ppm): 173.7 (C=O), 170.8 (C=O), 168.6 (C=O), 159.4 (*2) (C-OH arom), 151.9 (*2) (C-O arom), 146.5 (C arom), 140.8 (C-NH arom), 129.0 (*2) (CH arom), 126.9 (CH arom), 126.1 (C arom), 124.4 (CH arom), 113.2 (CH arom), 112.5 (*2) (CH arom), 109.7 (*2) (C arom), 102.2 (*2) (CH arom), 83.0 (C-O), 31.1 (CH₂), 28.7 (CH₂).

ESI-MS: $m/z = 446.06$ [M-H]⁻, 468.04 [M+Na-2H]⁻, 490.02 [M+2Na-3H]⁻.

8 *Nε-(Di-tert-butylacetate)-Nα-(fluorescein-5-aminocarbonyl)ethanamide)-L-lysine-N-(aminocarbonyl)ethanamido-DO3AtBu*



220 mg of **5** (197 μmol) was mixed with compound **7** (88.1 mg, 197 μmol , 1 equiv.), DIEA (65.1 μL , 394 μmol , 2 equiv.), EDCI (37.7 mg, 44.7 μmol , 1 equiv.), HOBT (26.6 mg, 197 μmol , 1 equiv.) in 10 mL of DMF. The mixture was stirred overnight in the dark at room temperature. The solvent was then evaporated under vacuum, and the product was dissolved in CH₂Cl₂ (20 mL). The organic layer was washed with water (2 x 20 mL), diluted citric acid solution adjusted to pH 2.8 (2 x 20 mL), and 5 % NaHCO₃ (2 x 20 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, and the solvent

was evaporated. The compound **8** (+ HPF₆) was obtained as an orange solid (m = 212 mg, 137 μmol, yield = 69 %).

¹H NMR (500 MHz, DMSO, 363 K) δ (ppm): 10.14 (s, 1H), 8.30 (m, 1H), 8.15 (m, 1H), 7.82 (m, 1H), 7.74 (m, 1H), 7.64 (m, 1H), 7.06 (m, 1H), 6.65 (m, 2H), 6.50 (m, 2H), 6.43 (m, 2H), 4.18 (m, 1H), 3.32 (s, 4H), 3.29-2.86 (m, 16H), 2.78-2.52 (m, 12H), 2.44-2.10 (m, 8H), 1.73 (m, 1H), 1.64-1.22 (m, 50H).

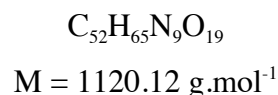
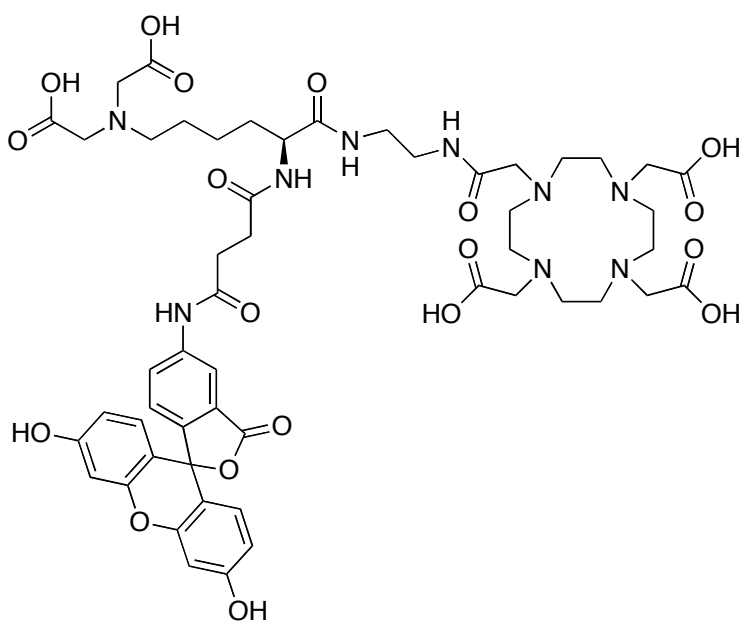
¹³C{¹H} NMR (125 MHz, DMSO, 363 K) δ (ppm): 171.8 (C=O), 171.5 (*2) (C=O), 171.4 (C=O), 171.2 (C=O), 170.1 (C=O), 170.6 (C=O), 169.6 (*2) (C=O), 167.9 (C=O), 155.2 (*2) (C-OH arom), 155.1 (*2) (C-O arom), 139.1 (*2) (C arom), 129.4 (*2) (CH arom), 127.1 (C arom), 127.2 (C arom), 120.3 (CH arom), 118.3 (*2) (CH arom), 117.9 (CH arom), 110.5 (*2) (C arom), 102.1 (*2) (CH arom), 80.8 (C tBu), 80.8 (*2) (C tBu), 79.6 (*2) (C tBu), 78.6 (C-O), 55.8, 55.4 (*2), 55.3, 55.2 (*2), 53.3, 52.7 (CH), 49.9 (*8), 38.2, 37.9, 31.6, 30.9, 30.3, 27.4 (*6) (CH₃ tBu), 27.3 (*6) (CH₃ tBu), 27.3 (*3) (CH₃ tBu), 26.7, 22.7.

ESI-MS: m/z = 1420.71 [M+Na-2H]⁺.

Elemental analysis for C₇₂H₁₀₅N₉O₁₉ · 6HPF₆:

- Calculated: C (55.91 %), H (6.91 %), N (8.15 %)
- Found: C (56.07 %), H (7.58 %), N (8.33 %)

9 *Nε-(Diacetic acid)-Nα-(fluorescein-5-aminocarbonyl)ethanamide-L-lysine-N-(aminocarbonyl)ethanamido-DOTA*



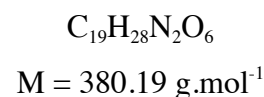
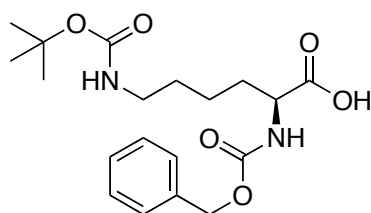
184.2 mg of **8** (119 μmol) were mixed with 92 μL of triisopropylsilane and 1.9 mL of trifluoroacetic acid in 1.9 mL of CH_2Cl_2 . The mixture was stirred 72 h in the dark at room temperature. The solution was concentrated under vacuum without heating, and the product was precipitated by addition of 5 mL of diethylether. The solid was filtered and rinsed with CH_2Cl_2 and diethyl ether, and the solid was dried under vacuum. The compound **9** (+ HPF_6 + 2 TFA) was obtained as a yellow powder ($m = 168$ mg, 115 μmol , yield = 97 %).

^1H NMR (500 MHz, DMSO, 363 K) δ (ppm): 10.24 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.97 (m, 1H), 7.85 (d, 1H, $^3J = 8.2$ Hz), 7.82 (m, 1H), 7.73 (m, 1H), 7.15 (d, 1H, $^3J = 8.2$ Hz), 6.69 (m, 2H), 6.62-6.52 (m, 4H), 4.19 (m, 1H), 3.60 (s, 2H), 3.58 (s, 4H), 3.51 (s, 2H), 3.41 (s, 4H), 3.21 (m, 4H), 3.11-2.83 (m, 16H), 2.73 (m, 2H), 2.67 (m, 2H), 2.56 (m, 2H), 1.71 (m, 1H), 1.57 (m, 1H), 1.45 (m, 2H), 1.31 (m, 2H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (125 MHz, DMSO, 363 K) δ (ppm): 171.6 (C=O), 171.0 (*3) (C=O), 171.0 (C=O), 170.8 (C=O), 170.7 (*2) (C=O), 170.5 (C=O), 168.1 (C=O), 159.2 (*2) (C-OH arom), 151.7 (*2) (C-O arom), 146.2 (C arom), 140.4 (C-NH arom), 128.2 (*2) (CH arom), 126.7 (C arom), 125.9 (CH arom), 123.7 (CH arom), 113.3 (CH arom), 112.2 (*2) (CH arom), 109.7 (*2) (C arom), 102.0 (*2) (CH arom), 83.1 (C-O), 55.4, 54.7 (*3), 54.2 (*2), 53.9, 52.7 (CH), 50.8 (*2), 50.4 (*2), 50.1 (*2), 49.8 (*2), 38.3, 37.8, 31.6, 31.2, 30.1, 26.0, 22.5.

ESI-MS: $m/z = 1120.44$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1142.43 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

10 *N* ϵ -(Carbo-*tert*-butoxy)-*N* α -(carbobenzyloxy)-*L*-lysine



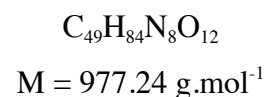
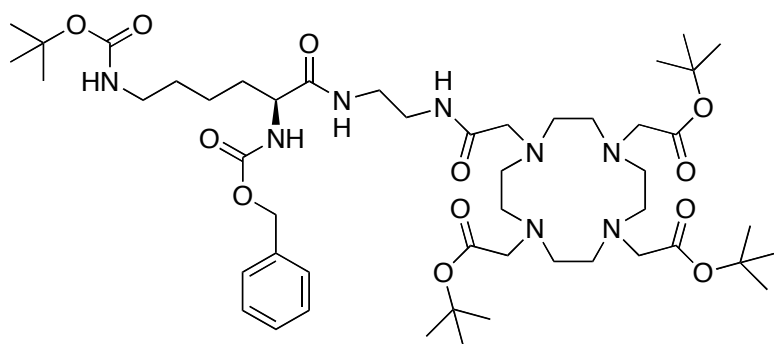
40 mL of a solution of di-*tert*-butyl dicarbonate (7.08 g, 32.4 mmol) in dioxane was added to a solution of *N* α -(carbobenzyloxy)-*L*-lysine (10 g, 35.7 mmol, 1.1 equiv.) in 0.9 M aqueous NaOH (40 mL). The resulting mixture was stirred overnight. Dioxane was evaporated and the pH of the aqueous solution was adjusted to pH 1.5 by adding 500 mL of a 10 % citric acid solution. The aqueous phase was extracted with CHCl_3 (3 \times 100 mL). The combined organic layers were dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. The resulting oil was taken in ether and the precipitate was filtered off. The filtrate was concentrated under vacuum and the compound **10** was obtained as a white foam ($m = 12$ g, 31.5 mmol, yield = 97 %).

^1H NMR (300 MHz, DMSO, 298 K) δ (ppm): 12.56 (bs, 1H), 7.51 (m, 1H), 7.42-7.25 (m, 5H), 6.77 (m, 1H), 5.03 (s, 2H), 3.90 (m, 1H), 2.87 (m, 2H), 1.64 (m, 1H), 1.57 (m, 1H), 1.36 (s, 9H), 1.32 (m, 4H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (75 MHz, DMSO, 298 K) δ (ppm): 174.0 (C=O), 156.2 (C=O), 155.6 (C=O), 137.0 (arom), 128.4 (*2) (arom), 127.8 (arom), 127.7 (*2) (arom), 77.4 (C tBu), 65.4 (CH₂ benzyl), 53.9 (CH), 39.7, 30.5, 29.1, 28.3 (*3) (CH₃ tBu), 22.9.

ESI-MS: $m/z = [\text{M}+\text{Na}]^+, [\text{M}-\text{H}+2 \text{Na}]^+$.

11 *N* ϵ -(Carbo-*tert*-butoxy)-*N* α -(carbobenzyloxy)-*L*-lysine-*N*-(aminocarbonyl)ethanamido-DO3AtBu



11 was synthesized according to the procedure used for the synthesis of **4**, starting from 327 mg of **10** (0.86 mmol), 584 mg of DO3AtBu-*N*-(2-aminoethyl)ethanamide (0.85 mmol, 1.1 equiv.), 330 mg of HBTU (0.86 mmol, 1equiv.), 120 mg of HOBt (0.86 mmol, 1 equiv.) and 284 μL of DIEA (1.72 mmol, 2 equiv.). The compound **11** (+ HPF₆) was obtained as a white foam ($m = 790$ mg, 0.70 mmol, yield = 82 %).

^1H NMR (500 MHz, DMSO, 363 K) δ (ppm): 7.79 (bs, 1H), 7.57 (bs, 1H), 7.39-7.26 (m, 5H), 6.83 (bs, 1H), 6.28 (bs, 1H), 5.05 (m, 2H), 3.96 (m, 1H), 3.29-3.08 (m, 8H), 3.08-2.97 (m, 4H), 2.93 (m, 2H), 2.84-2.52 (m, 8H), 2.47-2.13 (m, 8H), 1.66 (m, 1H), 1.57 (m, 1H), 1.47 (s, 9H), 1.45 (s, 18H), 1.42 (m, 2H), 1.39 (s, 9H), 1.31 (m, 2H).

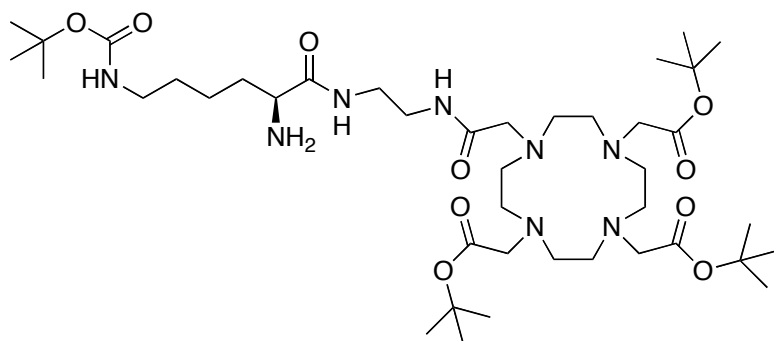
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (125 MHz, DMSO, 363 K) δ (ppm): 171.9 (C=O), 171.6 (*2) (C=O), 171.5 (C=O), 171.2 (C=O), 155.3 (C=O), 155.1 (C=O), 136.6 (arom), 127.7 (*2) (arom), 127.2 (arom), 127.0 (*2) (arom), 80.8 (C tBu), 80.7 (*2) (C tBu), 76.9 (C tBu), 65.1, 55.8, 55.3, 55.2 (*2), 54.6, 49.9 (*4), 49.8 (*4), 39.5, 38.3, 37.7, 31.4, 28.8, 27.8 (*3) (CH₃ tBu), 27.3 (*6) (CH₃ tBu), 27.2 (*3) (CH₃ tBu), 22.2.

ESI-MS: $m/z = 999.62 [\text{M}+\text{Na}]^+$.

Elemental analysis for $C_{49}H_{84}N_8O_{12} \cdot 6PF_6 \cdot 5H_2O$:

- Calculated: C (50.38 %), H (7.77 %), N (9.59 %)
- Found: C (50.30 %), H (7.80 %), N (9.76 %)

12 *Nε-(Carbo-tert-butoxy)-L-lysine-N-(aminocarbonyl)ethanamido-DO3AtBu*



$C_{41}H_{78}N_8O_{10}$
 $M = 843.11 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

12 was synthesized according to the procedure used for the synthesis of **5**, starting from 790 mg of **11** (0.70 mmol) and 36 mg of 10 % Pd/C (0.034 mmol, 0.04 equiv.). The compound **12** (+ HPF₆) was obtained as a white foam (m = 650 mg, 0.66 mmol, yield = 94 %).

¹H NMR (500 MHz, DMSO, 363 K) δ (ppm): 7.92 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 6.29 (s, 1H), 3.25-3.18 (m, 4H), 3.17-3.09 (m, 7H), 3.06 (s, 2H), 2.99-2.84 (m, 4H), 2.72 (bs, 8H), 2.34 (bs, 8H), 1.61 (m, 1H), 1.47 (s, 9H), 1.45 (s, 18H), 1.39 (s, 9H), 1.53-1.25 (m, 7H).

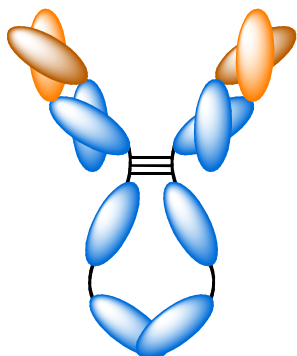
¹³C{¹H} NMR (125 MHz, DMSO, 363 K) δ (ppm): 174.5 (C=O), 171.9 (C=O), 171.5 (*2) (C=O), 171.2 (C=O), 155.1 (C=O), 80.8 (C tBu), 80.7 (*2) (C tBu), 76.9 (C tBu), 55.8, 55.3, 55.2 (*2), 54.3, 49.9 (*4), 49.8 (*4), 39.5, 38.4, 37.6, 34.1, 29.0, 27.8 (*3) (CH₃ tBu), 27.3 (*6) (CH₃ tBu), 27.2 (*3) (CH₃ tBu), 22.1.

ESI-MS: m/z = 865.58 [M+Na]⁺.

Elemental analysis for $C_{41}H_{78}N_8O_{10} \cdot 6PF_6 \cdot 5H_2O$:

- Calculated: C (47.62 %), H (8.19 %), N (10.84 %)
- Found: C (47.61 %), H (8.19 %), N (10.68 %)

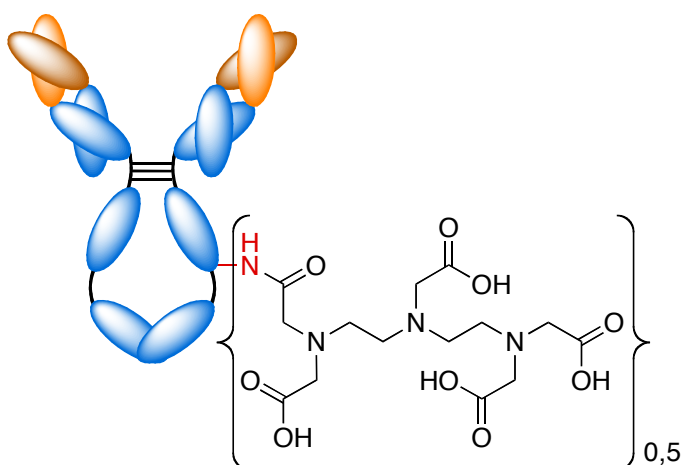
MARQUAGE D'ANTICORPS MONOCLONAUX

13 Purification of trastuzumab

$$M \approx 151300 \text{ kDa}$$

$$\epsilon_{280} \text{ (calculated)} \approx 218500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

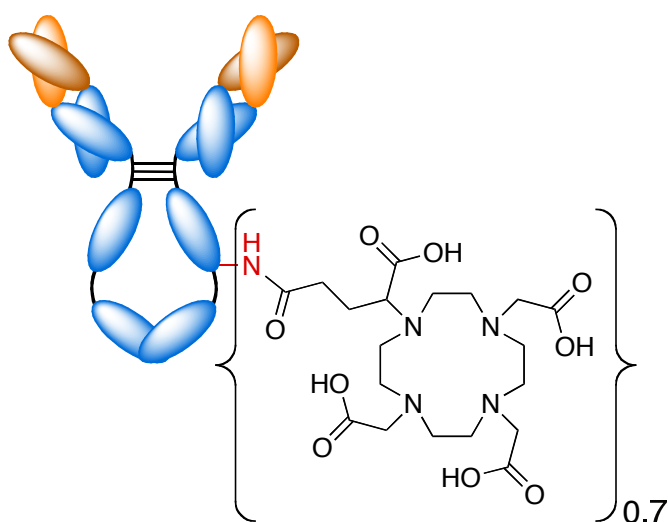
Following the instructions of the manufacturer, trastuzumab (Herceptin, Roche) was reconstituted in water to obtain a $21 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ solution of trastuzumab. Trastuzumab (150 mg) was purified from other excipients (histidine, polysorbate and α, α -trehalose) by ultrafiltration (Vivaspin 20TM filter 30 kDa, Pall, 4 h, at $2701 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) and washed twice with 15 mL of PBS 0.1 M, pH 7.4. The concentrated solution was diluted in 4 mL of PBS 0.1 M, pH 7.4, to give a final concentration of $33.92 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. The purified solution of trastuzumab **13** was stored at $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

14 Preparation of DTPA-trastuzumab conjugate (0.5:1)

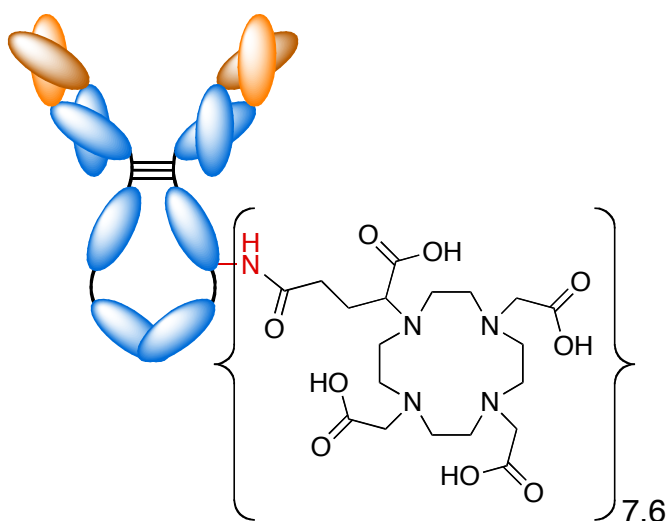
Conjugation was performed at a 1:1 DTPA-dianhydride / trastuzumab molar ratio. $2.3 \text{ } \mu\text{L}$ of a $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ suspension of **1** in dry chloroform ($0.47 \text{ } \mu\text{g}$, 1.33 nmol , 1 equiv.) were pipetted under ultrasonication and transferred to a polypropylene microtube. The chloroform was evaporated under

a gentle stream of nitrogen. 12.5 μL of a solution of **13** (16 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 200 μg , 1.33 nmol , 1 equiv.) in PBS 0.1 M, pH 7.4 were subsequently added and gently mixed at room temperature for 30 min. Unbound DTPA was then removed by ultrafiltration (NanosepTM filter 30 kDa, Pall, 12 min at $8100 \times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$). Conjugated trastuzumab was washed twice with 100 μL of PBS 0.1 M, pH 7.4, and the concentrated solution was diluted in 100 μL of PBS. The purified immunoconjugate **14** was stored at 4 $^{\circ}\text{C}$. Degree of labeling was around 0.5 DTPA per trastuzumab according to MALDI-TOF mass spectrometry.

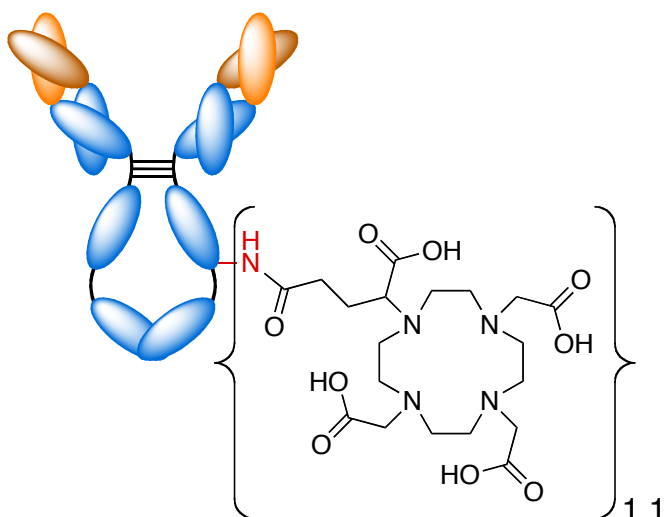
15 Preparation of DOTAGA-trastuzumab conjugate (0.7:1)



Conjugation was performed at a 1:1 DOTAGA-anhydride / trastuzumab molar ratio. 3.1 μL of a 0.2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ suspension of **2** in dry chloroform (0.61 μg , 1.33 nmol , 1 equiv.) were pipetted under ultrasonication and transferred to a polypropylene microtube. The chloroform was evaporated under a gentle stream of nitrogen. 12.5 μL of a solution of **13** (16 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 200 μg , 1.33 nmol , 1 equiv.) in PBS 0.1 M, pH 7.4 were subsequently added and gently mixed at room temperature for 30 min. Unbound DOTAGA was then removed by ultrafiltration (NanosepTM filter 30 kDa, Pall, 12 min at $8100 \times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$). Conjugated trastuzumab was washed twice with 100 μL of PBS 0.1 M, pH 7.4, and the concentrated solution was diluted in 100 μL of PBS. The purified immunoconjugate **15** was stored at 4 $^{\circ}\text{C}$. Degree of labeling was around 0.7 macrocycle per trastuzumab according to MALDI-TOF mass spectrometry.

16 Preparation of DOTAGA-trastuzumab conjugate (7.6:1)

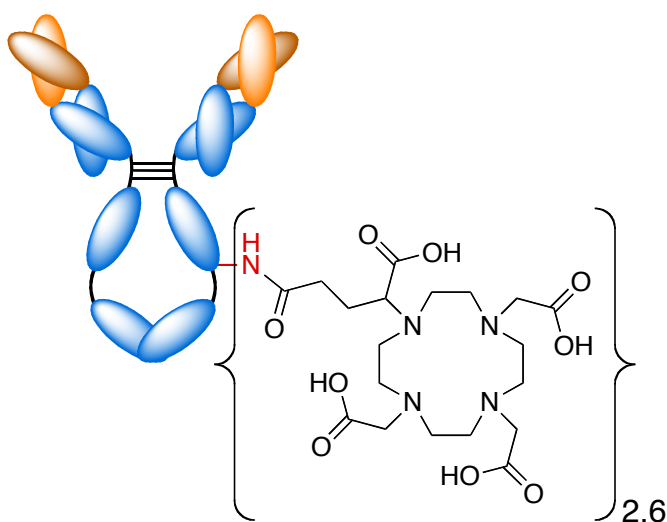
Conjugation was performed at a 20:1 DOTAGA-anhydride / trastuzumab molar ratio. The compound **16** was synthesized using the same procedure as compound **15**, using 12.2 μL of a 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ suspension of **2** in dry chloroform (12.2 μg , 26.6 nmol, 20 equiv.) and 12.5 μL of a solution of **13** (16 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 200 μg , 1.33 nmol, 1 equiv.) in PBS 0.1 M, pH 7.4. Finally, the purified immunoconjugate **16** was stored at 4 $^{\circ}\text{C}$. Degree of labeling was around 7.6 macrocycles per trastuzumab according to MALDI-TOF mass spectrometry.

17 Preparation of DOTAGA-trastuzumab conjugate (1.1:1)

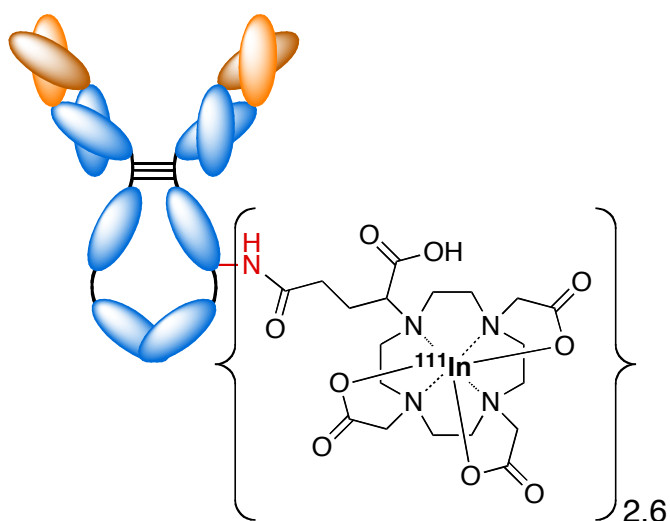
Conjugation was performed at a 6:1 DOTAGA-anhydride / trastuzumab molar ratio. The compound **17** was synthesized using the same procedure as compound **15**, using 7.5 μL of a 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ suspension of **2** in dry chloroform (37.5 μg , 82 nmol, 6 equiv.) and 500 μL of a solution of

13 ($4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 2 mg, 13.7 nmol, 1 equiv.) in PBS 0.1 M, pH 7.4. Finally, the purified immunoconjugate **17** was stored at $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Degree of labeling was around 1.1 macrocycles per trastuzumab according to MALDI-TOF mass spectrometry.

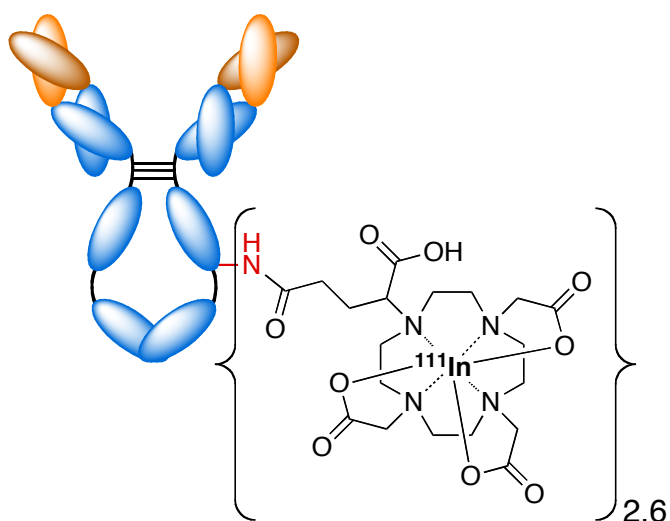
18 Preparation of DOTAGA-trastuzumab conjugate (2.6:1)



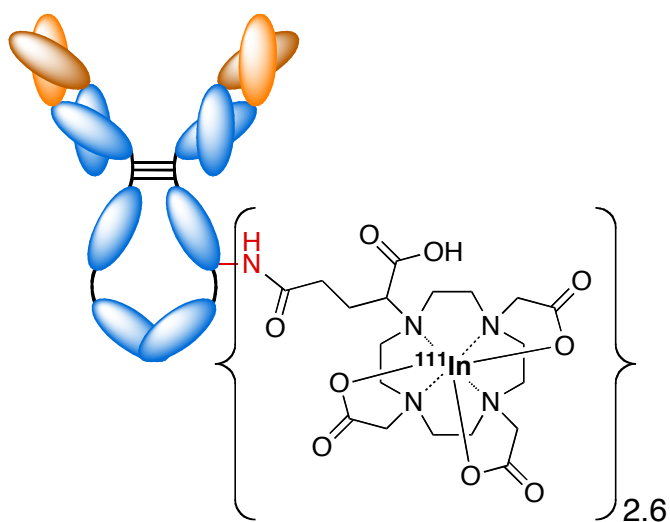
Conjugation was performed at a 20:1 DOTAGA-anhydride / trastuzumab molar ratio. The compound **18** was synthesized using the same procedure as compound **15**, using $36.2 \text{ }\mu\text{L}$ of a $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ suspension of **2** in dry chloroform ($181.6 \text{ }\mu\text{g}$, $0.39 \text{ }\mu\text{mol}$, 20 equiv.) and $88.4 \text{ }\mu\text{L}$ of a solution of **13** ($33.92 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 3 mg, 19.8 nmol, 1 equiv.) in PBS 0.1 M, pH 7.4. Finally, the purified immunoconjugate **18** was stored at $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Degree of labeling was around 2.6 macrocycles per trastuzumab according to MALDI-TOF mass spectrometry.

19 Radiolabeling of **18** ($400 \text{ MBq} \cdot \text{mg}^{-1}$)

12 MBq of $^{111}\text{InCl}_3$ in HCl 0.05 M (14 μL , 7 pmol) were added to a solution of **18** (30 μg , 200 pmol, 28.5 equiv.) in ammonium acetate buffer 0.1 M pH 5.7, so that the final solution reaches a buffer / HCl ratio of 1.5. The solution was stirred in a thermomixer at 37 $^\circ\text{C}$ for 1 h. 3 μL of a 50 mM EDTA solution in ammonium acetate buffer (0.1 M, pH 5.7) were added, and the resulting mixture was stirred for another 15 min at 25 $^\circ\text{C}$. The radiolabeled immunoconjugate was then purified by ultrafiltration (NanosepTM filter 30 kDa, Pall, 9 min at $8100 \times g$, 4 $^\circ\text{C}$) to remove ^{111}In -EDTA complexes. ^{111}In -DOTAGA-trastuzumab was washed once with 100 μL of PBS 0.1 M, pH 7.4, and the concentrated solution of **19** was diluted in 100 μL of PBS. Instant thin layer chromatography (ITLC) was performed before and after ultrafiltration to determine radiolabeling yield and radiochemical purity. 1 μL of each solution was applied on ITLC-SG strips at 2 cm of the bottom. The solvent (sodium citrate 0.1 M pH 5) was allowed to rise to 10 cm from the bottom of the strips. The strips were then analyzed using a γ radiochromatograph (Raytest miniGITA-Star). Radiolabeling yield was 75 %, and radiochemical purity after purification step was >99 %.

20 Radiolabeling of **18** for *in vitro* studies ($150 \text{ MBq}\cdot\text{mg}^{-1}$)

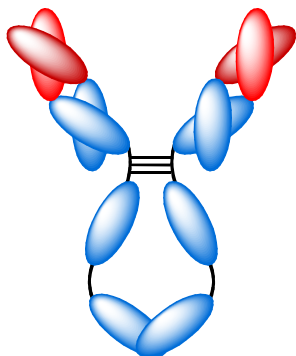
The compound **20** was obtained using the same procedure as compound **19**, using 6 MBq of $^{111}\text{InCl}_3$ in HCl 0.05 M (7 μL , 3.5 pmol) and 40 μg (264 pmol, 75 equiv.) of **18** in ammonium acetate buffer 0.1 M pH 5.7, so that the final solution reaches a buffer / HCl ratio of 1.5. The radiolabeling was performed in 1 h at 37 $^\circ\text{C}$. Finally, radiolabeling yield was 66 %, and radiochemical purity after purification step was >99 %.

21 Radiolabeling of **18** for *in vivo* studies ($1 \text{ GBq}\cdot\text{mg}^{-1}$)

The compound **21** was obtained using the same procedure as compound **19**, using 125 MBq of $^{111}\text{InCl}_3$ in HCl 0.05 M (147 - 187 μL , 72.6 pmol) and 125 μg (820 pmol, 11 equiv.) of **18** in ammonium acetate buffer 0.1 M pH 5.7, so that the final solution reaches a buffer / HCl ratio of 1.5.

The radiolabeling was performed in 3 h at 37 °C. Finally, radiolabeling yield was 62 %, and radiochemical purity after purification step was >99 %.

22 Purification of cetuximab

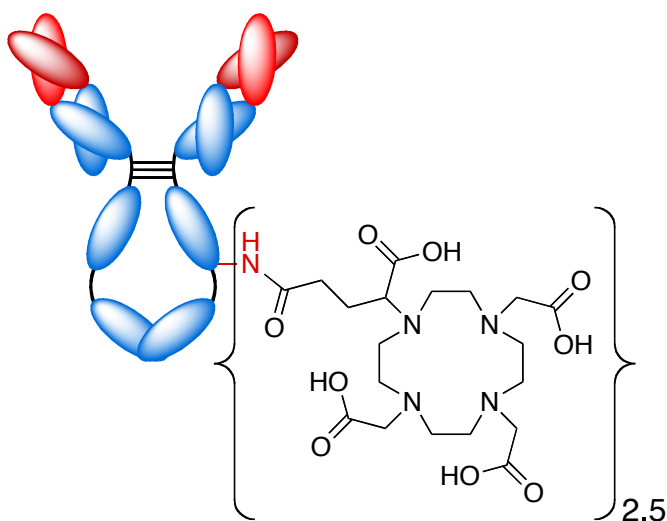


$$M \approx 151700 \text{ kDa}$$

$$\epsilon_{280} \text{ (calculated)} \approx 218900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Cetuximab (Erbix, Merck, 100 mg) was purified from other excipients (sodium chloride, glycine, polysorbate 80, citric acid monohydrate and sodium hydroxyde) by ultrafiltration (Vivaspin 20TM filter 30 kDa, Pall, 4 h at 2701 x g, 4 °C) and washed twice with 15 mL of PBS 0.1 M, pH 7.4. The concentrated solution was diluted in 4 mL of PBS 0.1 M, pH 7.4, to give a final concentration of 30.14 mg.mL⁻¹. The purified solution of cetuximab **22** was stored at 4 °C.

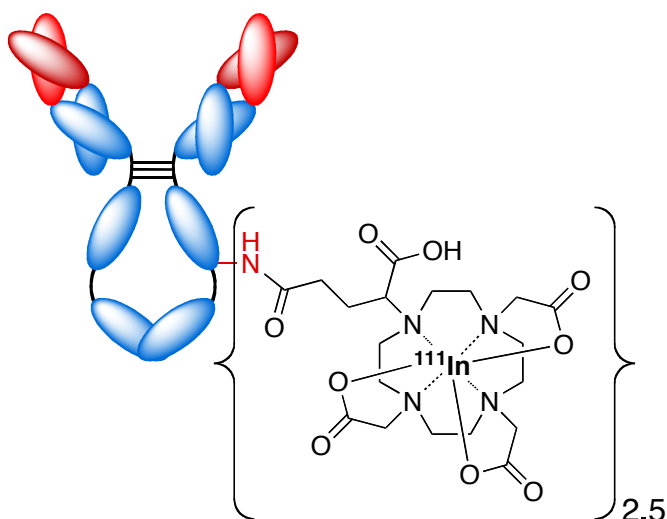
23 Preparation of DOTAGA-cetuximab conjugate (2.5:1)



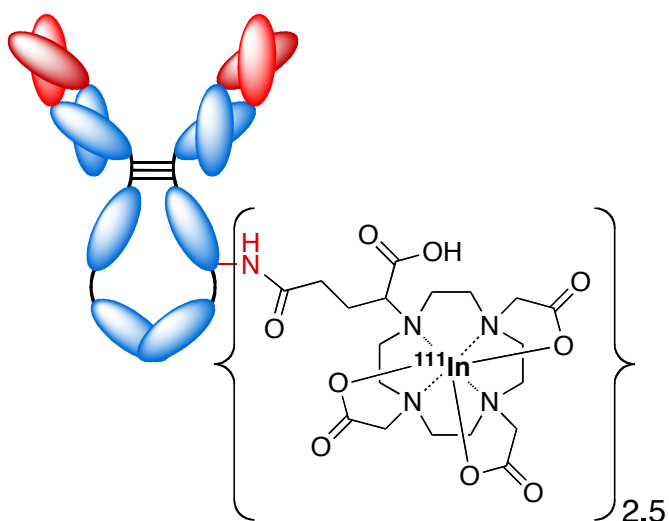
Conjugation was performed at a 20:1 DOTAGA-anhydride / cetuximab molar ratio. 36.2 μL of a 5 mg.mL⁻¹ suspension of **2** in dry chloroform (181.6 μg , 0.39 μmol , 20 equiv.) were pipetted

under ultrasonication and transferred to a polypropylene microtube. The chloroform was evaporated under a gentle stream of nitrogen. 99.5 μL of a solution of **22** ($30.14 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 3 mg, 19.8 nmol, 1 equiv.) in PBS 0.1 M, pH 7.4 were subsequently added. The solution was completed to 750 μL ($4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) with PBS and gently mixed at 25 °C for 30 min. Unbound DOTAGA was then removed by ultrafiltration (NanosepTM filter 30 kDa, Pall, 12 min at $8100 \times g$, 4 °C). Conjugated cetuximab was washed twice with 500 μL of PBS 0.1 M, pH 7.4, and the concentrated solution was diluted in 500 μL of PBS. The purified immunoconjugate **23** was stored at 4 °C. Degree of labeling was around 2.5 macrocycles per cetuximab according to MALDI-TOF mass spectrometry.

24 Radiolabeling of **23** for *in vitro* studies ($150 \text{ MBq}\cdot\text{mg}^{-1}$)

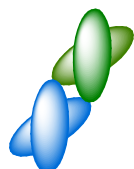


6 MBq of $^{111}\text{InCl}_3$ in HCl 0.05 M (7 μL , 3.5 pmol) were added to a solution of **23** (40 μg , 264 pmol, 75 equiv.) in ammonium acetate buffer 0.1 M pH 5.7, so that the final solution reaches a buffer / HCl ratio of 1.5. The solution was stirred in a thermomixer at 37 °C for 1 h. 15 μL of a 50 mM EDTA solution in ammonium acetate buffer (0.1 M, pH 5.7) were added, and the resulting mixture was mixed for another 15 min at 25 °C. The radiolabeled immunoconjugate **24** was then purified by ultrafiltration (NanosepTM filter 30 kDa, Pall, 12 min at $8100 \times g$, 4 °C) to remove ^{111}In -EDTA complexes. ^{111}In -DOTAGA-trastuzumab was washed once with 100 μL of PBS 0.1 M, pH 7.4, and the concentrated solution was diluted in 100 μL of PBS. Instant thin layer chromatography (ITLC) was performed before and after ultrafiltration to determine radiolabeling yield and radiochemical purity. 1 μL of each solution was applied on ITLC-SG strips at 2 cm of the bottom. The solvent (sodium citrate 0.1 M pH 5) was allowed to rise to 10 cm from the bottom of the strips. The strips were then analyzed using a γ radiochromatograph (Bioscan AR-2000). Radiolabeling yield was 58 %, and radiochemical purity after purification step was >99 %.

25 Radiolabeling of **23** for *in vivo* studies ($1 \text{ GBq} \cdot \text{mg}^{-1}$)

The compound **25** was obtained using the same procedure as compound **24**, using 125 MBq of $^{111}\text{InCl}_3$ in HCl 0.05 M (147 - 187 μL , 72.6 pmol) and 125 μg (820 pmol, 11 equiv.) of **23** in ammonium acetate buffer 0.1 M pH 5.7, so that the final solution reaches a buffer / HCl ratio of 1.5. The radiolabeling was performed in 3 h at 37 $^\circ\text{C}$. Finally, radiolabeling yield was 32 %, and radiochemical purity after purification step was >99 %.

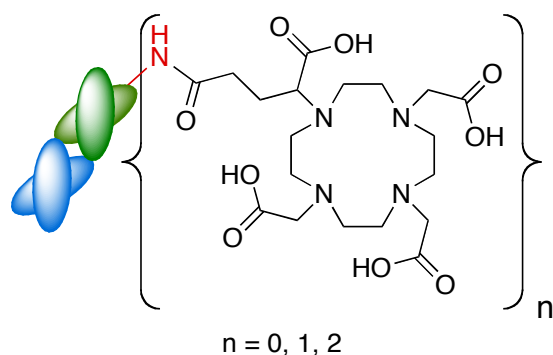
GREFFAGE D'AGENTS CHÉLATANT BIFONCTIONNELS SUR L'ABCIXIMAB

26 Purification of abciximab

$$M \approx 47600 \text{ kDa}$$

$$\epsilon_{280} \text{ (calculated)} \approx 80400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

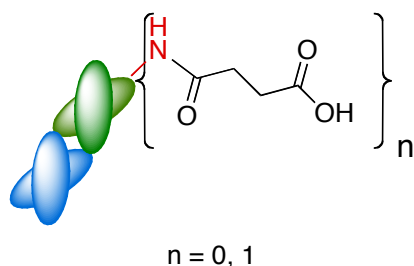
Abciximab (ReoPro[®], Eli Lilly) was purified from other excipients (disodium phosphate dihydrate, sodium dihydrogen phosphate monohydrate, sodium chloride, polysorbate 80) by ultrafiltration (Vivaspin 20TM filter 10 kDa, Pall, 4 h at $2701 \times g$, 4 °C) and washed twice with 15 mL of PBS 0.1 M, pH 7.4. The concentrated solution was diluted in 4 mL of PBS 0.1 M, pH 7.4, to give a final concentration of $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. The purified solution of abciximab 26 was stored at 4 °C.

27 - 32 Preparation of DOTAGA-abciximab conjugates (0, 1, 2:1)

Conjugations were performed at different DOTAGA-anhydride / abciximab molar ratios (1:1, 5:1, 10:1, 13:1, 16:1, 20:1). 2-40.2 μL of a $0.23 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ suspension of 2 in dry chloroform (0.23-4.58 μg , 0.5-10 nmol, 1-20 equiv.) were pipetted under ultrasonication and transferred to polypropylene microtubes. The chloroform was evaporated under a gentle stream of nitrogen. 25 μL of a solution of purified abciximab ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 25 μg , 0.5 nmol, 1 equiv.) in PBS 0.1 M, pH 7.4 were subsequently added. The different solutions were gently mixed at 25 °C for 1 h and unbound DOTAGA was then removed by ultrafiltration (NanosepTM filter 10 kDa, Pall, 9 min at $8100 \times g$, 4 °C). Conjugated abciximab was washed twice with 100 μL of PBS 0.1 M, pH 7.4, and the concentrated solutions were diluted in 25 μL of PBS. The purified immunoconjugates 27 - 32 were

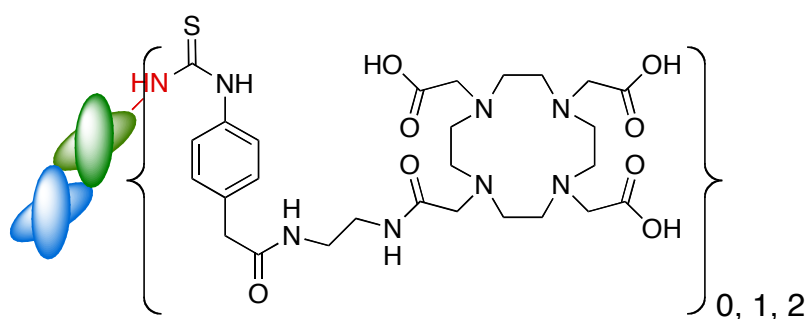
stored at 4 °C. Degree of labeling ranged from 0 to 2 macrocycles per abciximab according to MALDI-TOF mass spectrometry.

33 - 37 Preparation of succinic acid-abciximab conjugate (0, 1:1)



Conjugations were performed at different succinic-anhydride / abciximab molar ratios (1:1, 5:1, 10:1, 15:1, 20:1). 1-20 μL of a 0.05 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ suspension of succinic anhydride in dry chloroform (0.05-1 μg , 0.5-10 nmol, 1-20 equiv.) were pipetted under ultrasonication and transferred to polypropylene microtubes. The chloroform was evaporated under a gentle stream of nitrogen. 25 μL of a solution of purified abciximab (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 25 μg , 0.5 nmol, 1 equiv.) in PBS 0.1 M, pH 7.4 were subsequently added. The different solutions were gently mixed at 25 °C for 1 h and unbound succinic acid was then removed by ultrafiltration (NanosepTM filter 10 kDa, Pall, 12 min at $8100 \times g$, 4 °C). Conjugated abciximab were washed twice with 100 μL of PBS 0.1 M, pH 7.4, and the concentrated solutions were diluted in 25 μL of PBS. The purified immunoconjugates **33 - 37** were stored at 4 °C. Degree of labeling ranged from 0 to 1 succinic acid per abciximab according to MALDI-TOF mass spectrometry.

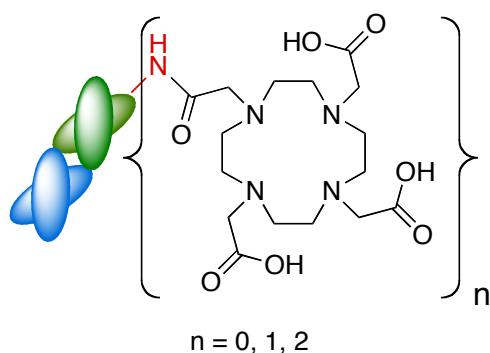
38 Preparation of DOTA-NCS-abciximab conjugate (0, 1, 2:1)



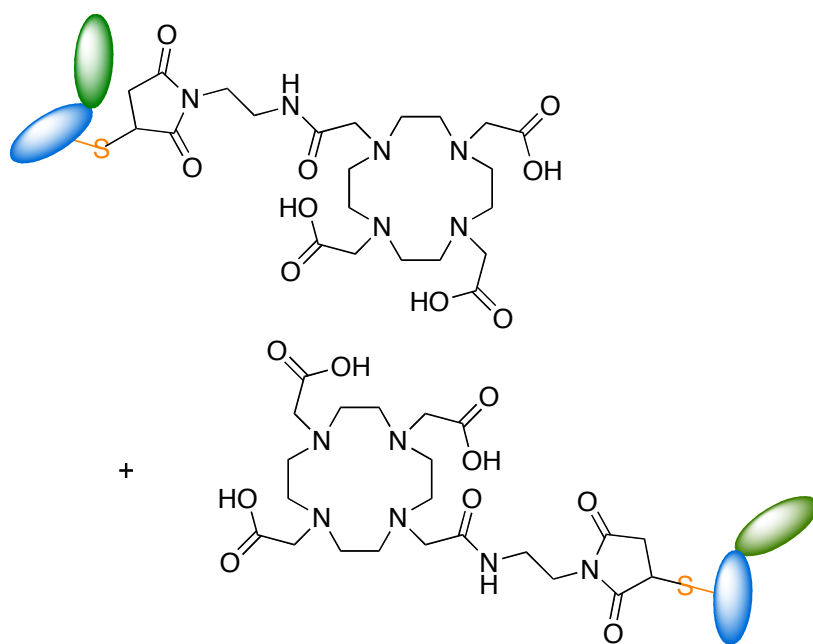
Conjugation was performed at a 20:1 DOTA-NCS / abciximab molar ratio. 1.3 μL of a 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ solution of DOTA-NCS in carbonate-bicarbonate buffer (2.7 μg , 3.5 nmol, 10 equiv.) were added to 17.5 μL of a solution of purified abciximab (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 17.5 μg , 0.35 nmol, 1 equiv.) in

carbonate-bicarbonate buffer 0.2 M, pH 9. The solution was gently mixed at 25 °C for 4 h. Unbound DOTA-NCS was then removed by ultrafiltration (Nanosep™ filter 10 kDa, Pall, 8 min at $8100 \times g$, 4 °C). Conjugated abciximab was washed with 100 μL of carbonate - bicarbonate buffer and twice with 200 μL of PBS 0.1 M, pH 7.4, and the concentrated solution was diluted in 25 μL of PBS. The purified immunoconjugate **38** was stored at 4 °C. Degree of labeling ranged from 0 to 2 macrocycles per abciximab according to MALDI-TOF mass spectrometry.

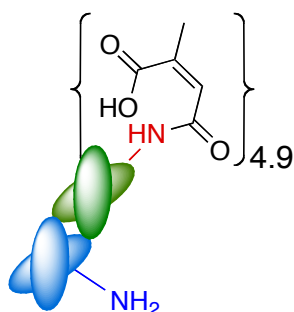
39 - 40 Preparation of DOTA-NHS – abciximab conjugate (0, 1, 2:1)



Conjugations were performed at a 10:1 or 20:1 DOTA-NHS / abciximab molar ratio. 1-2 μL of a 4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ suspension of DOTA-NHS in dry chloroform (3.8-7.6 μg , 5-10 nmol, 10-20 equiv.) were pipetted under ultrasonication and transferred to polypropylene microtubes. The chloroform was evaporated under a gentle stream of nitrogen. 16.3 μL of a solution of purified abciximab (1.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 25 μg , 0.5 nmol, 1 equiv.) in NaHCO_3 0.1 M, pH 8.5 were subsequently added. The solutions were completed to 25 μL with NaHCO_3 buffer and gently mixed at 37 °C for 4 h. Unbound DOTA-NHS was then removed by ultrafiltration (Nanosep™ filter 10 kDa, Pall, 8 min at $8100 \times g$, 4 °C). Conjugated abciximab were washed twice with 200 μL of PBS 0.1 M, pH 7.4, and the concentrated solutions were diluted in 25 μL of PBS. The purified immunoconjugates **39** and **40** were stored at 4 °C. Degree of labeling ranged from 0 to 2 macrocycles per abciximab according to MALDI-TOF mass spectrometry.

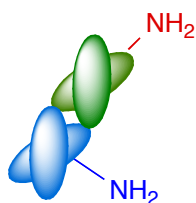
41 Preparation of Mal-DOTA-abciximab conjugate

Tris-HCl and EDTA were added in the abciximab stock solution **26** (50 μg , 1 nmol, 1 equiv.) to reach 50 mM Tris-HCl and 50 mM EDTA. TCEP was added in this solution to reach 1 mM TCEP, and the mixture was left one hour at 37 $^{\circ}\text{C}$ for reduction. Reduced Fab **26'** was purified from TCEP by ultracentrifugation, and the product was washed twice with 200 μL of PBS containing EDTA at 1 mM. The concentrated solution was diluted in 40 μL of PBS-EDTA and was reacted with 10 μL of a 15 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ solution of Mal-DOTA in PBS (0.15 mg, 200 nmol, 200 equiv.) for 2 h at 37 $^{\circ}\text{C}$. Unbound Mal-DOTA was then removed by ultrafiltration (NanosepTM filter 10 kDa, Pall, 8 min at 8100 $\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$). Conjugated abciximab was washed twice with 200 μL of PBS 0.1 M, pH 7.4, and the concentrated solution was diluted in 50 μL of PBS. The purified immunoconjugate **41** was stored at 4 $^{\circ}\text{C}$. The thioether bound formation was quantitative according to MALDI-TOF mass spectrometry.

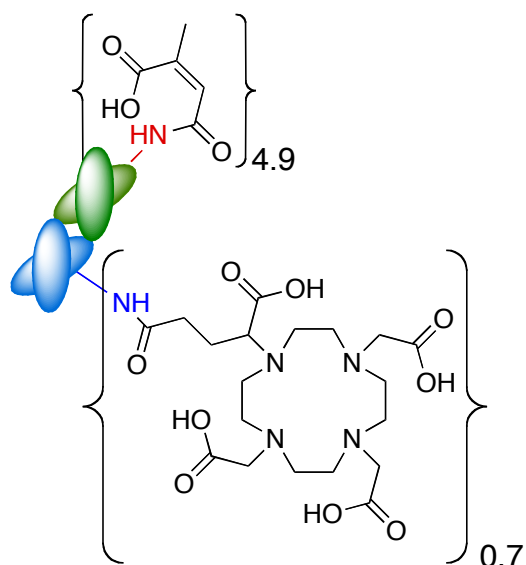
42 Preparation of citraconic acid (CA)-abciximab conjugate (4.9:1)

Conjugation was performed at a 10:1 citraconic anhydride / abciximab molar ratio. 10 μL of a 0.45 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ solution of citraconic anhydride in dry chloroform (9 μg , 80 nmol, 20 equiv.) were transferred to a polypropylene microtube. The chloroform was evaporated under a gentle stream of nitrogen. 100 μL of a solution of purified abciximab (2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 200 μg , 4 nmol, 1 equiv.) in PBS 0.1 M, pH 7.4 were subsequently added. The solution was completed to 200 μL with PBS and gently mixed at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h. Unbound citraconic acid was then removed by ultrafiltration (NanosepTM filter 10 kDa, Pall, 12 min at 8100 $\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$). Conjugated abciximab was washed twice with 200 μL of PBS 0.1 M, pH 7.4, and the concentrated solution was diluted in 200 μL of PBS. The purified immunoconjugate CA – abciximab was stored at 4 $^{\circ}\text{C}$. Degree of labeling was about 4.9 citraconic acids per abciximab according to MALDI-TOF mass spectrometry.

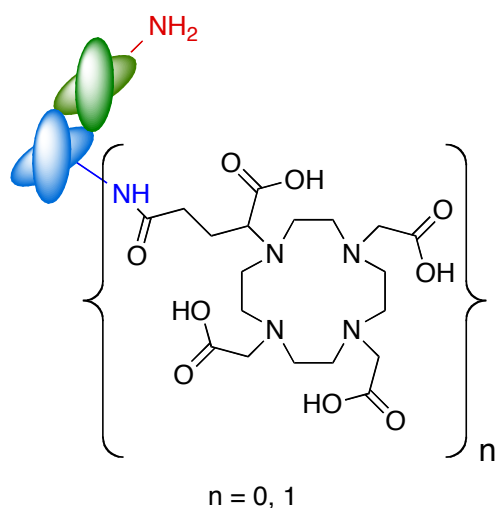
43 Preparation of abciximab by deprotection of **42**



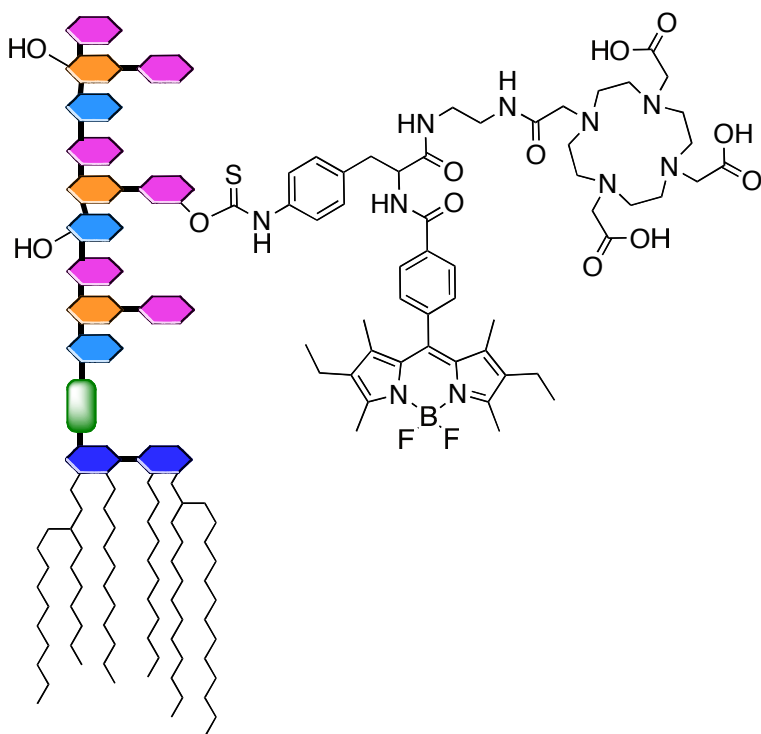
50 μL of **42** (50 μg , 1 nmol) were added to 400 μL of ammonium acetate buffer 0.1 M, pH 3.7. The solution was gently mixed at 35 $^{\circ}\text{C}$ for 3 h. Deprotected abciximab was purified by ultrafiltration (NanosepTM filter 10 kDa, Pall, 15 min at 8100 $\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$). Compound **43** was washed once with 500 μL of PBS 0.5 M, pH 7.4, and then twice with PBS 0.1 M, pH 7.4. The concentrated solution was diluted in 50 μL of PBS. The purified abciximab **43** was stored at 4 $^{\circ}\text{C}$. Complete deprotection of abciximab was assessed by MALDI-TOF mass spectrometry.

44 Preparation of CA-abciximab-DOTAGA conjugate

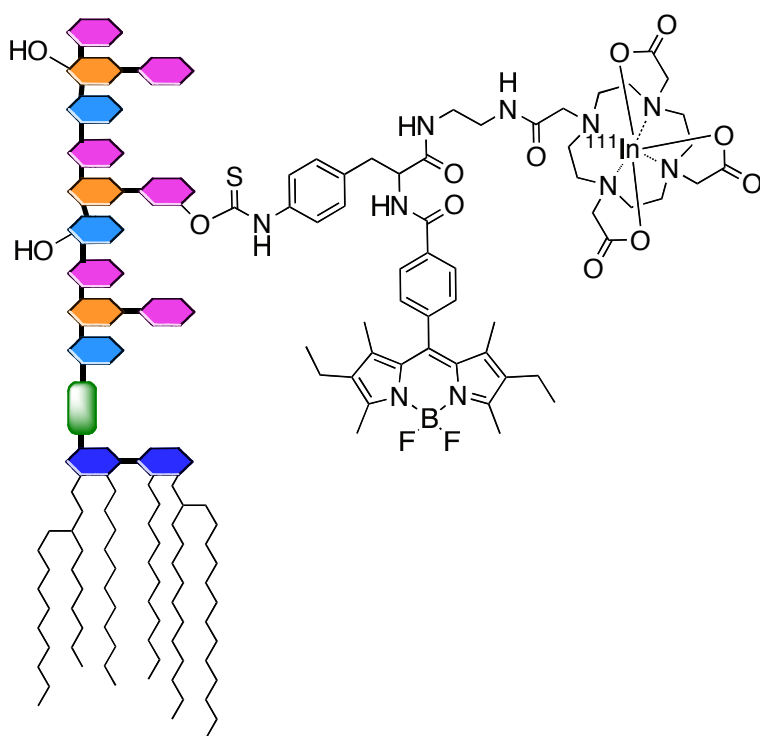
Conjugation was performed at a 20:1 DOTAGA-anhydride / CA-abciximab molar ratio. 8 μL of a $2.87 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ suspension of **2** in dry chloroform ($22.9 \mu\text{g}$, 40 nmol, 20 equiv.) were pipetted under ultrasonication and transferred to polypropylene microtubes. The chloroform was evaporated under a gentle stream of nitrogen. 100 μL of **42** ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 100 μg , 2 nmol, 1 equiv.) in PBS 0.1 M, pH 7.4 were subsequently added and the solution was gently mixed at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h. Unbound DOTAGA was removed by ultrafiltration (NanosepTM filter 10 kDa, Pall, 12 min at $8100 \times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$). Conjugated abciximab **44** was washed twice with 100 μL of PBS 0.1 M, pH 7.4, and the concentrated solution was diluted in 100 μL of PBS. The purified immunoconjugate **44** was stored at 4 $^{\circ}\text{C}$. Degree of labeling was around 0.7 DOTAGA per CA-abciximab according to MALDI-TOF mass spectrometry.

45 Preparation of abciximab – DOTAGA conjugate (0, 1:1)

50 μL of **45** (50 μg , 1 nmol) were added to 400 μL of ammonium acetate buffer 0.1 M, pH 3.7. The solution was gently mixed at 35 $^{\circ}\text{C}$ for 3 h. Deprotected abciximab – DOTAGA was purified by ultrafiltration (NanosepTM filter 10 kDa, Pall, 15 min at 8100 $\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$). Conjugated abciximab was washed once with 500 μL of PBS 0.5 M, pH 7.4, and then twice with PBS 0.1 M, pH 7.4. The concentrated solution was diluted in 50 μL of PBS. The purified immunoconjugate abciximab-DOTAGA was stored at 4 $^{\circ}\text{C}$. Complete deprotection was assessed by MALDI-TOF mass spectrometry, and the degree of labeling ranged from 0 to 1 DOTAGA per abciximab.

46 Preparation of LPS – DOTA-Bodipy conjugate

Conjugation was performed at a 1:1 DOTA-Bodipy-NCS / LPS molar ratio, assuming that $M_{LPS} \approx 10$ kDa. 5.3 μL of a 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ solution of DOTA-Bodipy-NCS NaHCO_3 0.1 M buffer (10.6 μg , 10 nmol, 1 equiv.) were added to a solution of LPS from *E. Coli* in NaHCO_3 0.1 M buffer (100 μL , 100 μg , 10 nmol, 1 equiv. The solution was gently mixed at 37 °C for 1 h. Unbound DOTA-Bodipy-NCS was then removed by FPLC gel filtration (Superdex 75, isocratic elution with PBS 1X, then 20 % EtOH). The collected fractions were then concentrated by ultrafiltration (NanosepTM filter 3 kDa, Pall, 15 min at 8100 $\times g$, 4 °C) and diluted in PBS 0.1 M to reach a 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ final concentration. The purified compound **46** was stored at 4 °C.

47 Radiolabeling of **46** for *in vivo* studies ($1 \text{ GBq} \cdot \text{mg}^{-1}$)

150 MBq of $^{111}\text{InCl}_3$ in HCl 0.05 M (224 μL , 87.1 pmol) were added to a solution of **46** (150 μg , 820 pmol, 11 equiv.) in ammonium acetate buffer 0.1 M pH 5.7, so that the final solution reaches a buffer / HCl ratio of 1.5. The solution was incubated at 60 °C and vortexed (1000 rpm) for 2 h. 15 μL of a 50 mM EDTA solution in ammonium acetate buffer (0.1 M, pH 5.7) were added, and the resulting mixture was mixed for another 15 min at 25 °C. The radiolabeled immunoconjugate **47** was then purified by ultrafiltration (NanosepTM filter 3 kDa, Pall, 12 min at 8100 $\times g$, 4 °C) to remove ^{111}In -EDTA complexes. ^{111}In -DOTA-Bodipy-LPS was washed once with 100 μL of PBS 0.1 M, pH 7.4, and the concentrated solution was diluted in 1 mL of 0.9 % NaCl solution for injection. Instant thin layer chromatography (ITLC) was performed before and after ultrafiltration to determine radiolabeling yield and radiochemical purity. 1 μL of each solution was applied on ITLC-SG strips at 2 cm of the bottom. The solvent (sodium citrate 0.1 M pH 5) was allowed to rise to 10 cm from the bottom of the strips. The strips were then analyzed using a γ radiochromatograph (Bioscan AR-2000). Radiolabeling yield was 60 %, and radiochemical purity after purification step was >99 %.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Lindner, J. R., Molecular imaging with contrast ultrasound and targeted microbubbles. *J. Nucl. Cardiol.*, **2004**, *11*, 215.
- (2) Rumack, C. M.; Wilson, S. R.; Charboneau, J. W., *Diagnostic Ultrasound*. Mosby, New York; **1998**.
- (3) Foster, F. S.; Cheung, K.; Cherin, E., Ultrasound. in *Molecular Imaging: Principles and Practice*, PMPH-USA; **2010**.
- (4) Achilefu, S.; Culver, J.; Akers, W., Multimodality molecular imaging with combined optical and SPECT/PET modalities. *J. Nucl. Med.*, **2008**, *49*, 169.
- (5) Kobayashi, H.; Ogawa, M.; Alford, R.; Choyke, P. L.; Urano, Y., New Strategies for Fluorescent Probe Design in Medical Diagnostic Imaging. *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 2620.
- (6) Urano, Y.; Asanuma, D.; Hama, Y.; Koyama, Y.; Barrett, T.; Kamiya, M.; Nagano, T.; Watanabe, T.; Hasegawa, A.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H., Selective molecular imaging of viable cancer cells with pH-activatable fluorescence probes. *Nat. Med.*, **2009**, *15*, 104.
- (7) Caravan, P., Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium based MRI contrast agents. *Chem. Soc. Rev.*, **2006**, *35*, 512.
- (8) Toth, E.; Merbach, A., *The Chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging*. John Wiley & Son, Ltd., Chichester; **2001**.
- (9) Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B., Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: Structure, dynamics, and applications. *Chem. Rev.*, **1999**, *99*, 2293.
- (10) Tsourkas, A.; Thorek, D. L. J.; Chen, A.; Czupryna, J., Superparamagnetic iron oxide nanoparticle probes for molecular imaging. *Ann. Biomed. Eng.*, **2006**, *34*, 23.
- (11) http://en.wikipedia.org/wiki/File:Bluthirnschranke_nach_Infarkt_nativ_und_KM.png
- (12) Toth, E.; Bonnet, C. S., Towards highly efficient, intelligent and bimodal imaging probes: Novel approaches provided by lanthanide coordination chemistry. *C. R. Chim.*, **2010**, *13*, 700.
- (13) Kryza, D.; Taleb, J.; Janier, M.; Marmuse, L.; Miladi, I.; Bonazza, P.; Louis, C.; Perriat, P.; Roux, S.; Tillement, O.; Billotey, C., Biodistribution Study of Nanometric Hybrid Gadolinium Oxide Particles as a Multimodal SPECT/MR/Optical Imaging and Theragnostic Agent. *Bioconjugate Chem*, **2011**, *22*, 1145.
- (14) Brechbiel, M. W.; Nwe, K.; Bryant, L. H., Poly(amidoamine) Dendrimer Based MRI Contrast Agents Exhibiting Enhanced Relaxivities Derived via Metal Preligation Techniques. *Bioconjugate Chem.*, **2010**, *21*, 1014.
- (15) Brechbiel, M. W.; Nwe, K.; Milenic, D.; Bryant, L. H.; Regino, C. A. S., Preparation, characterization and in vivo assessment of Gd-albumin and Gd-dendrimer conjugates as intravascular contrast-enhancing agents for MRI. *J. Inorg. Biochem.*, **2011**, *105*, 722.
- (16) <http://spiral.univ-lyon1.fr/17-SWF/page.asp?id=2833&page=&sdp=1>
- (17) http://www.yale.edu/imaging/techniques/spect_camera/index.html
- (18) Lodge, M. A.; Braess, H.; Mahmoud, F.; Suh, J.; Englar, N.; Geysler-Stoops, S.; Jenkins, J.; Bacharach, S. L.; Dilsizian, V., Developments in nuclear cardiology: transition from single

- photon emission computed tomography to positron emission tomography-computed tomography. *J. Invasive Cardiol.*, **2005**, *17*, 491.
- (19) Kung, H. F., Radiochemistry of SPECT: Examples of ^{99m}Tc and ¹¹¹In Complexes. in *Molecular Imaging: Principles and Practice*, PMPH-USA; **2010**.
- (20) Mountz, J. M.; Liu, H. G.; Deutsch, G., Neuroimaging in cerebrovascular disorders: Measurement of cerebral physiology after stroke and assessment of stroke recovery. *Semin. Nucl. Med.*, **2003**, *33*, 56.
- (21) Lee, D. S.; Lee, H. Y.; Paeng, J. C.; Lee, J. S.; Oh, C. W.; Cho, M. J.; Chung, J. K.; Lee, M. C., Efficacy assessment of cerebral arterial bypass surgery using statistical parametric mapping and probabilistic brain atlas on basal/acetazolamide brain perfusion SPECT. *J. Nucl. Med.*, **2004**, *45*, 202.
- (22) Inoue, K.; Ito, H.; Goto, R.; Kinomura, S.; Taki, Y.; Okada, K.; Sato, K.; Sato, T.; Kanno, I.; Fukuda, H., Database of normal human cerebral blood flow measured by SPECT: I. Comparison between I-123-IMP, Tc-99m-HMPAO, and Tc-99m-ECD as referred with O-15 labeled water PET and voxel-based morphometry. *Ann. Nucl. Med.*, **2006**, *20*, 131.
- (23) Schibli, R.; Mindt, T. L.; Muller, C.; Melis, M.; de Jong, M., "Click-to-Chelate": In vitro and in vivo comparison of a Tc-99m(CO)(3)-labeled N(τ)-histidine folate derivative with its isostructural, clicked 1,2,3-triazole analogue. *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 1689.
- (24) Schibli, R.; Struthers, H.; Spingler, B.; Mindt, T. L., "Click-to-Chelate": Design and incorporation of triazole-containing metal-chelating systems into biomolecules of diagnostic and therapeutic interest. *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 6173.
- (25) Mindt, T. L.; Muller, C.; Stuker, F.; Salazar, J. F.; Hohn, A.; Mueggler, T.; Rudin, M.; Schibli, R., A "Click Chemistry" Approach to the Efficient Synthesis of Multiple Imaging Probes Derived from a Single Precursor. *Bioconjugate Chem.*, **2009**, *20*, 1940.
- (26) Rennen, H. J. J. M.; Boerman, O. C.; Koenders, E. B.; Oyen, W. J. G.; Corstens, F. H. M., Labeling proteins with Tc-99m via hydrazinonicotinamide (HYNIC): Optimization of the conjugation reaction. *Nucl. Med. Biol.*, **2000**, *27*, 599.
- (27) Blankenberg, F. G.; Vanderheyden, J.-L.; Strauss, H. W.; Tait, J. F., Radiolabeling of HYNIC-annexin V with technetium-99m for in vivo imaging of apoptosis. *Nat. Protoc.*, **2006**, *1*, 108.
- (28) De Jong, M.; Bakker, W. H.; Krenning, E. P.; Breeman, W. A. P.; Pluijm, M. E.; Bernard, B. F.; Visser, T. J.; Jermann, E.; Béhé, M.; Powell, P.; Maecke, H. R., Yttrium-90 and indium-111 labelling, receptor binding and biodistribution of [DOTA0,d-Phe1,Tyr3]octreotide, a promising somatostatin analogue for radionuclide therapy. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **1997**, *24*, 368.
- (29) Otte, A.; Jermann, E.; Behe, M.; Goetze, M.; Bucher, H. C.; Roser, H. W.; Heppeler, A.; MuellerBrand, J.; Maecke, H. R., DOTATOC: a powerful new tool for receptor-mediated radionuclide therapy. *Eur. J. Nucl. Med.*, **1997**, *24*, 792.
- (30) http://www.jens-langner.de/ftp/langner_mscthesi.pdf
- (31) <http://spiral.univ-lyon1.fr/17-SWF/page.asp?id=2834>
- (32) Ido, T.; Wan, C. N.; Casella, V.; Fowler, J. S.; Wolf, A. P.; Reivich, M.; Kuhl, D. E., Labeled 2-deoxy-D-glucose analogs. 18F-labeled 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose, 2-deoxy-2-fluoro-D-mannose and 14C-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **1978**, *14*, 175.

- (33) Chen, X. Y.; Liu, Z. F.; Niu, G.; Wang, F., (68)Ga-labeled NOTA-RGD-BBN peptide for dual integrin and GRPR-targeted tumor imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2009**, *36*, 1483.
- (34) Maecke, H. R.; Mansi, R.; Wang, X. J.; Forrer, F.; Kneifel, S.; Tamma, M. L.; Waser, B.; Cescato, R.; Reubi, J. C., Evaluation of a 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-Tetraacetic Acid-Conjugated Bombesin-Based Radioantagonist for the Labeling with Single-Photon Emission Computed Tomography, Positron Emission Tomography, and Therapeutic Radionuclides. *Clin. Cancer Res.*, **2009**, *15*, 5240.
- (35) Eder, M.; Knackmuss, S.; Le Gall, F.; Reusch, U.; Rybin, V.; Little, M.; Haberkorn, U.; Mier, W.; Eisenhut, M., (68)Ga-labelled recombinant antibody variants for immuno-PET imaging of solid tumours. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2010**, *37*, 1397.
- (36) Feldwisch, J.; Baum, R. P.; Prasad, V.; Muller, D.; Schuchardt, C.; Orlova, A.; Wennborg, A.; Tolmachev, V., Molecular Imaging of HER2-Expressing Malignant Tumors in Breast Cancer Patients Using Synthetic (111)In- or (68)Ga-Labeled Affibody Molecules. *J. Nucl. Med.*, **2010**, *51*, 892.
- (37) Fani, M.; Del Pozzo, L.; Abiraj, K.; Mansi, R.; Tamma, M. L.; Cescato, R.; Waser, B.; Weber, W. A.; Reubi, J. C.; Maecke, H. R., PET of Somatostatin Receptor-Positive Tumors Using ⁶⁴Cu- and ⁶⁸Ga-Somatostatin Antagonists: The Chelate Makes the Difference. *J. Nucl. Med.*, **2011**, *52*, 1110.
- (38) <http://www.petct-zentrum-hamburg.de/aerzteinformationen.php>
- (39) <http://www.medical.siemens.com>
- (40) Ogawa, M.; Regino, C. A. S.; Seidel, J.; Green, M. V.; Xi, W.; Williams, M.; Kosaka, N.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H., Dual-Modality Molecular Imaging using Antibodies Labeled with Activatable Fluorescence and a Radionuclide for Specific and Quantitative Targeted Cancer Detection. *Bioconjugate Chem.*, **2009**, *20*, 2177.
- (41) Gutowski, M.; Carcenac, M.; Pourquier, D.; Larroque, C.; Saint-Aubert, B.; Rouanet, P.; Pelegrin, A., Intraoperative immunophotodetection for radical resection of cancers: evaluation in an experimental model. *Clin. Cancer Res.*, **2001**, *7*, 1142.
- (42) Kuil, J.; Velders, A. H.; Van Leeuwen, F. W. B., Multimodal Tumor-Targeting Peptides Functionalized with Both a Radio- and a Fluorescent Label. *Bioconjugate Chem.*, **2010**, *21*, 1709.
- (43) Buckle, T.; Van Leeuwen, A. C.; Chin, P. T.; Janssen, H.; Muller, S. H.; Jonkers, J.; Van Leeuwen, F. W. B., A self-assembled multimodal complex for combined pre- and intraoperative imaging of the sentinel lymph node. *Nanotechnology*, **2010**, *21*, 355101/1.
- (44) Troyan, S. L.; Kianzad, V.; Gibbs-Strauss, S. L.; Gioux, S.; Matsui, A.; Oketokoun, R.; Ngo, L.; Khamene, A.; Azar, F.; Frangioni, J. V., The FLARE intraoperative near-infrared fluorescence imaging system: a first-in-human clinical trial in breast cancer sentinel lymph node mapping. *Ann. Surg. Oncol.*, **2009**, *16*, 2943.
- (45) Van der Poel, H. G.; Buckle, T.; Brouwer, O. R.; Valdes-Olmos, R. A.; Van Leeuwen, F. W. B., Intraoperative laparoscopic fluorescence guidance to the sentinel lymph node in prostate cancer patients: clinical proof of concept of an integrated functional imaging approach using a multimodal tracer. *Eur. Urol.*, **2011**, *60*, 826.
- (46) Achilefu, S.; Jimenez, H. N.; Dorshow, R. B.; Bugaj, J. E.; Webb, E. G.; Wilhelm, R. R.; Rajagopalan, R.; Jöhler, J.; Erion, J. L., Synthesis, In Vitro Receptor Binding, and In Vivo Evaluation of Fluorescein and Carbocyanine Peptide-Based Optical Contrast Agents. *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 2003.

- (47) Brechbiel, M. W.; Xu, H.; Baidoo, K.; Gunn, A. J.; Boswell, C. A.; Milenic, D. E.; Choyke, P. L., Design, synthesis, and characterization of a dual modality positron emission tomography and fluorescence Imaging agent for monoclonal antibody tumor-targeted imaging. *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 4759.
- (48) Edwards, W. B.; Xu, B.; Akers, W.; Cheney, P. P.; Liang, K.; Rogers, B. E.; Anderson, C. J.; Achilefu, S., Agonist-Antagonist Dilemma in Molecular Imaging: Evaluation of a Monomolecular Multimodal Imaging Agent for the Somatostatin Receptor. *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 192.
- (49) Liang, M.; Liu, X.; Cheng, D.; Liu, G.; Dou, S.; Wang, Y.; Rusckowski, M.; Hnatowich, D. J., Multimodality Nuclear and Fluorescence Tumor Imaging in Mice Using a Streptavidin Nanoparticle. *Bioconjugate Chem.*, **2010**, *21*, 1385.
- (50) Cobleigh, M. A.; Vogel, C. L.; Tripathy, D.; Robert, N. J.; Scholl, S.; Fehrenbacher, L.; Wolter, J. M.; Paton, V.; Shak, S.; Lieberman, G.; Slamon, D. J., Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J. Clin. Oncol.*, **1999**, *17*, 2639.
- (51) McLaughlin, P.; Grillo-Lopez, A. J.; Link, B. K.; Levy, R.; Czuczman, M. S.; Williams, M. E.; Heyman, M. R.; Bence-Bruckler, I.; White, C. A.; Cabanillas, F.; Jain, V.; Ho, A. D.; Lister, J.; Wey, K.; Shen, D.; Dallaire, B. K., Rituximab chimeric Anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: Half of patients respond to a four-dose treatment program. *J. Clin. Oncol.*, **1998**, *16*, 2825.
- (52) Witzig, T. E.; Gordon, L. I.; Cabanillas, F.; Czuczman, M. S.; Emmanouilides, C.; Joyce, R.; Pohlman, B. L.; Bartlett, N. L.; Wiseman, G. A.; Padre, N.; Grillo-Lopez, A. J.; Multani, P.; White, C. A., Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, **2002**, *20*, 2453.
- (53) Kaminski, M. S.; Estes, J.; Zasadny, K. R.; Francis, I. R.; Ross, C. W.; Tuck, M.; Regan, D.; Fisher, S.; Gutierrez, J.; Kroll, S.; Stagg, R.; Tidmarsh, G.; Wahl, R. L., Radioimmunotherapy with iodine I-131 tositumomab for relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma: updated results and long-term follow-up of the University of Michigan experience. *Blood*, **2000**, *96*, 1259.
- (54) Baty, D.; Chames, P., Le point sur les anticorps autorisés en imagerie et en immunothérapie. *IBS*, **2006**, *21*, 255.
- (55) <http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Anticorps.png>
- (56) Scheen, A. J., Nomenclature internationale des différents types d'anticorps monoclonaux. *Rev. Med. Liege*, **2009**, 120.
- (57) Holliger, P.; Hudson, P. J., Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol.*, **2005**, *23*, 1126.
- (58) Mach, J. P.; Chatal, J. F.; Lumbroso, J. D.; Buchegger, F.; Forni, M.; Ritschard, J.; Berche, C.; Douillard, J. Y.; Carrel, S.; Herlyn, M.; et al., Tumor localization in patients by radiolabeled monoclonal antibodies against colon carcinoma. *Cancer Res.*, **1983**, *43*, 5593.
- (59) Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*. Academic Press, **1996**.
- (60) Schmidt, P.; Smith, S.; Bundesen, P., 188Re DD-3B6/22 Fab' for use in therapy of ovarian cancer: labelling and animal studies. *Nucl. Med. Biol.*, **1998**, *25*, 639.

- (61) Dennis, M. S.; Jin, H. K.; Dugger, D.; Yang, R. H.; McFarland, L.; Ogasawara, A.; Williams, S.; Cole, M. J.; Ross, S.; Schwall, R., Imaging tumors with an albumin-binding Fab, a novel tumor-targeting agent. *Cancer Res.*, **2007**, *67*, 254.
- (62) Misri, R.; Saatchi, K.; Häfeli, U. O., Radiolabeling of fab and f(ab')₂ antibody fragments with ^{99m}Tc(I) tricarbonyl core using a new bifunctional tridentate ligand. *Nucl. Med. Commun.*, **2011**, *32*, 324.
- (63) Olafsen, T.; Wu, A. M., Antibody Vectors for Imaging. *Semin. Nucl. Med.*, **2010**, *40*, 167.
- (64) Colcher, D.; Bird, R.; Roselli, M.; Hardman, K. D.; Johnson, S.; Pope, S.; Dodd, S. W.; Pantoliano, M. W.; Milenic, D. E.; Schlom, J., In vivo tumor targeting of a recombinant single-chain antigen-binding protein. *J. Natl. Cancer Inst.*, **1990**, *82*, 1191.
- (65) Nedelman, M. A.; Shealy, D. J.; Boulin, R.; Brunt, E.; Seasholtz, J. I.; Allen, I. E.; McCartney, J. E.; Warren, F. D.; Oppermann, H.; Pang, R. H.; Berger, H. J.; Weisman, H. F., Rapid infarct imaging with a technetium-99m-labeled antimyosin recombinant single-chain Fv: evaluation in a canine model of acute myocardial infarction. *J. Nucl. Med.*, **1993**, *34*, 234.
- (66) Pietersz, G. A.; Patrick, M. R.; Chester, K. A., Preclinical characterization and in vivo imaging studies of an engineered recombinant technetium-99m-labeled metallothionein-containing anti-carcinoembryonic antigen single-chain antibody. *J. Nucl. Med.*, **1998**, *39*, 47.
- (67) Schott, M. E.; Milenic, D. E.; Yokota, T.; Whitlow, M.; Wood, J. F.; Fordyce, W. A.; Cheng, R. C.; Schlom, J., Differential metabolic patterns of iodinated versus radiometal chelated anticarcinoma single-chain Fv molecules. *Cancer Res.*, **1992**, *52*, 6413.
- (68) Reilly, R. M.; Maiti, P. K.; Kiarash, R.; Prashar, A. K.; Fast, D. G.; Entwistle, J.; Dan, M. D.; Narang, S. A.; Foote, S.; Kaplan, H. A., Rapid imaging of human melanoma xenografts using an scFv fragment of the human monoclonal antibody H11 labelled with In-111. *Nucl. Med. Commun.*, **2001**, *22*, 587.
- (69) Adams, G. P.; Schier, R.; McCall, A. M.; Crawford, R. S.; Wolf, E. J.; Weiner, L. M.; Marks, J. D., Prolonged in vivo tumour retention of a human diabody targeting the extracellular domain of human HER2/neu. *Br. J. Cancer*, **1998**, *77*, 1405.
- (70) Marks, J. D.; Nielsen, U. B.; Adams, G. P.; Weiner, L. M., Targeting of bivalent anti-ErbB2 diabody antibody fragments to tumor cells is independent of the intrinsic antibody affinity. *Cancer Res.*, **2000**, *60*, 6434.
- (71) Schneider, D. W.; Heitner, T.; Alicke, B.; Light, D. R.; McLean, K.; Satozawa, N.; Parry, G.; Yoo, J.; Lewis, J. S.; Parry, R., In Vivo Biodistribution, PET Imaging, and Tumor Accumulation of (86)Y- and (111)In-Antimindin/RG-1, Engineered Antibody Fragments in LNCaP Tumor-Bearing Nude Mice. *J. Nucl. Med.*, **2009**, *50*, 435.
- (72) Scott, A. M.; Kelly, M. P.; Lee, F. T.; Tahtis, K.; Power, B. E.; Smyth, F. E.; Brechbiel, M. W.; Hudson, P. J., Tumor targeting by a multivalent single-chain Fv (scFv) anti-Lewis Y antibody construct. *Cancer Biother. Radiopharm.*, **2008**, *23*, 411.
- (73) Wu, A. M.; Yazaki, P. J.; Tsai, S. W.; Nguyen, K.; Anderson, A. L.; McCarthy, D. W.; Welch, M. J.; Shively, J. E.; Williams, L. E.; Raubitschek, A. A.; Wong, J. Y. C.; Toyokuni, T.; Phelps, M. E.; Gambhir, S. S., High-resolution microPET imaging of carcino-embryonic antigen-positive xenografts by using a copper-64-labeled engineered antibody fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2000**, *97*, 8495.
- (74) Wu, A. M.; Sundaresan, G.; Yazaki, P. J.; Shively, J. E.; Finn, R. D.; Larson, S. M.; Raubitschek, A. A.; Williams, L. E.; Chatziioannou, A. F.; Gambhir, S. S., I-124-labeled

- engineered Anti-CEA minibodies and diabodies allow high-contrast, antigen-specific small-animal PET imaging of xenografts in athymic mice. *J. Nucl. Med.*, **2003**, *44*, 1962.
- (75) Wu, A. M., Antibodies and Antimatter: The Resurgence of Immuno-PET. *J. Nucl. Med.*, **2009**, *50*, 2.
- (76) Olafsen, T.; Tan, G. J.; Cheung, C. W.; Yazaki, P. J.; Park, J. M.; Shively, J. E.; Williams, L. E.; Raubitschek, A. A.; Press, M. F.; Wu, A. M., Characterization of engineered anti-p185(HER-2) (scFv-C(H)3)(2) antibody fragments (minibodies) for tumor targeting. *Protein Eng. Des. Sel.*, **2004**, *17*, 315.
- (77) Olafsen, T.; Kenanova, V. E.; Sundaresan, G.; Anderson, A. L.; Crow, D.; Yazaki, P. J.; Li, L.; Press, M. F.; Williams, L. E.; Wong, J. Y. C.; Raubitschek, A. A.; Shively, J. E.; Wu, A. M., Optimizing radiolabeled engineered anti-p185(HER2) antibody fragments for in vivo imaging. *Cancer Res.*, **2005**, *65*, 5907.
- (78) Wu, A. M.; Leyton, J. V.; Olafsen, T.; Lepin, E. J.; Hahm, S.; Bauer, K. B.; Reiter, R. E., Humanized Radioiodinated Minibody For Imaging of Prostate Stem Cell Antigen-Expressing Tumors. *Clin. Cancer Res.*, **2008**, *14*, 7488.
- (79) Wu, A. M.; Kenanova, V.; Olafsen, T.; Crow, D. M.; Sundaresan, G.; Subbarayan, M.; Carter, N. H.; Ikle, D. N.; Yazaki, P. J.; Chatziioannou, A. F.; Gambhir, S. S.; Williams, L. E.; Shively, J. E.; Colcher, D.; Raubitschek, A. A., Tailoring the pharmacokinetics and positron emission tomography imaging properties of anti-carcinoembryonic antigen single-chain Fv-Fc antibody fragments. *Cancer Res.*, **2005**, *65*, 622.
- (80) Andersen, J. T.; Justesen, S.; Fleckenstein, B.; Michaelsen, T. E.; Berntzen, G.; Kenanova, V. E.; Daba, M. B.; Lauvrak, V.; Buus, S.; Sandlie, I., Ligand binding and antigenic properties of a human neonatal Fc receptor with mutation of two unpaired cysteine residues. *FEBS J.*, **2008**, *275*, 4097.
- (81) Huang, L.; Gai kam, L. O. T.; Caveliers, V.; Vanhove, C.; Keyaerts, M.; De Baetselier, P.; Bossuyt, A.; Revets, H.; Lahoutte, T., SPECT imaging with (99m)Tc-labeled EGFR-specific nanobody for in vivo monitoring of EGFR expression. *Mol. Imaging Biol.*, **2008**, *10*, 167.
- (82) Stahl, S.; Friedman, M., Engineered affinity proteins for tumour-targeting applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **2009**, *53*, 1.
- (83) Dias, C. R.; Jeger, S.; Osso Jr, J. A.; Müller, C.; De Pasquale, C.; Hohn, A.; Waibel, R.; Schibli, R., Radiolabeling of rituximab with 188Re and 99mTc using the tricarbonyl technology. *Nucl. Med. Biol.*, **2011**, *38*, 19.
- (84) Bernhard, C., *Thèse de l'Université de Bourgogne*, **2011**.
- (85) Smith-Jones, P. M.; Vallabahajosula, S.; Goldsmith, S. J.; Navarro, V.; Hunter, C. J.; Bastidas, D.; Bander, N. H., In vitro characterization of radiolabeled monoclonal antibodies specific for the extracellular domain of prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res.*, **2000**, *60*, 5237.
- (86) Smith-Jones, P. M.; Solit, D. B.; Akhurst, T.; Afroze, F.; Rosen, N.; Larson, S. M., Imaging the pharmacodynamics of HER2 degradation in response to Hsp90 inhibitors. *Nat. Biotechnol.*, **2004**, *22*, 701.
- (87) Mease, R. C.; Mausner, L. F.; Srivastava, S. C., US5428156A, **1995**.
- (88) Mukai, T.; Namba, S.; Arano, Y.; Ono, M.; Fujioka, Y.; Uehara, T.; Ogawa, K.; Konishi, J.; Saji, H., Synthesis and evaluation of a monoreactive DOTA derivative for indium-111-based residualizing label to estimate protein pharmacokinetics. *J. Pharm. Pharmacol.*, **2002**, *54*, 1073.

- (89) Li, C.; Winnard, P. T.; Takagi, T.; Artemov, D.; Bhujwala, Z. M., Multimodal Image-Guided Enzyme/Prodrug Cancer Therapy. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 15072.
- (90) Kovacs, Z.; De Leon-Rodriguez, L. M., The synthesis and chelation chemistry of DOTA-peptide conjugates. *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 391.
- (91) Capretta, A.; Maharajh, R. B.; Bell, R. A., Synthesis and characterization of cyclomaltoheptaose-based metal chelants as probes for intestinal permeability. *Carbohydr. Res.*, **1995**, *267*, 49.
- (92) Aime, S.; Barge, A.; Botta, M.; Frullano, L.; Merlo, U.; Hardcastle, K. I., Multinuclear and multifrequency NMR study of gadolinium(III) complexes with bis-amide derivatives of ethylenedioxydiethylenedinitrilotetraacetic acid. *Dalton Trans.*, **2000**, 3435.
- (93) Jaeger, D. A.; Peacock, M. F.; Bohle, D. S., A Surfactant Transition Metal Chelate. *Langmuir*, **2003**, *19*, 4859.
- (94) Fichna, J.; Janecka, A., Synthesis of target-specific radiolabeled peptides for diagnostic Imaging. *Bioconjugate Chem.*, **2003**, *14*, 3.
- (95) Zitha-Bovens, E.; Muller, R. N.; Laurent, S.; Vander, E. L.; Geraldès, C. F. G. C.; Van Bekkum, H.; Peters, J. A., Structure and dynamics of lanthanide complexes of triethylenetetramine-N,N,N',N'',N''',N''''-hexaacetic acid (H6ttha) and of diamides H4ttha(NHR) derived from H6ttha as studied by NMR, NMRD, and EPR. *Helv. Chim. Acta*, **2005**, *88*, 618.
- (96) Lub-de Hooge, M. N.; Kosterink, J. G.; Perik, P. J.; Nijhuis, H.; Tran, L.; Bart, J.; Suurmeijer, A. J.; De Jong, S.; Jager, P. L.; De Vries, E. G., Preclinical characterisation of ¹¹¹In-DTPA-trastuzumab. *Br. J. Pharmacol.*, **2004**, *143*, 99.
- (97) Brechbiel, M. W.; Gansow, O. A.; Atcher, R. W.; Schlom, J.; Esteban, J.; Simpson, D.; Colcher, D., Synthesis of 1-(p-isothiocyanatobenzyl) derivatives of DTPA and EDTA. Antibody labeling and tumor-imaging studies. *Inorg. Chem.*, **1986**, *25*, 2772.
- (98) Izard, M. E.; Boniface, G. R.; Hardiman, K. L.; Brechbiel, M. W.; Gansow, O. A.; Walker, K. Z., An improved method for labeling monoclonal antibodies with samarium-153: use of the bifunctional chelate 2-(p-isothiocyanatobenzyl)-6-methyldiethylenetriaminepentaacetic acid. *Bioconjugate Chem.*, **1992**, *3*, 346.
- (99) Bernhard, C.; Goze, C.; Rousselin, Y.; Denat, F., First bodipy-DOTA derivatives as probes for bimodal imaging. *Chem. Commun.*, **2010**.
- (100) Westerberg, D. A.; Carney, P. L.; Rogers, P. E.; Kline, S. J.; Johnson, D. K., Synthesis of novel bifunctional chelators and their use in preparing monoclonal antibody conjugates for tumor targeting. *J. Med. Chem.*, **1989**, *32*, 236.
- (101) McMurry, T. J.; Brechbiel, M.; Kumar, K.; Gansow, O. A., Convenient synthesis of bifunctional tetraaza macrocycles. *Bioconjugate Chem.*, **1992**, *3*, 108.
- (102) Peuralahti, J.; Merioe, L.; Mikkala, V.-M.; Blomberg, K.; Hovinen, J., Synthesis and properties of a neutral derivative of diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 4760.
- (103) Josephson, L.; Tung, C.-H.; Moore, A.; Weissleder, R., High-Efficiency Intracellular Magnetic Labeling with Novel Superparamagnetic-Tat Peptide Conjugates. *Bioconjugate Chem.*, **1999**, *10*, 186.
- (104) Kang, H. W.; Josephson, L.; Petrovsky, A.; Weissleder, R.; Bogdanov, A., Jr., Magnetic Resonance Imaging of Inducible E-Selectin Expression in Human Endothelial Cell Culture. *Bioconjugate Chem.*, **2002**, *13*, 122.

- (105) Vazquez-Dorbatt, V.; Tolstyka, Z. P.; Chang, C.-W.; Maynard, H. D., Synthesis of a Pyridyl Disulfide End-Functionalized Glycopolymer for Conjugation to Biomolecules and Patterning on Gold Surfaces. *Biomacromolecules*, **2009**, *10*, 2207.
- (106) Lacerda, S.; Campello, M. P.; Marques, F.; Gano, L.; Kubicek, V.; Fouskova, P.; Toth, E.; Santos, I., A novel tetraazamacrocycle bearing a thiol pendant arm for labeling biomolecules with radiolanthanides. *Dalton Trans.*, **2009**, 4509.
- (107) Dubowchik, G. M.; Radia, S.; Mastalerz, H.; Walker, M. A.; Firestone, R. A.; King, H. D.; Hofstead, S. J.; Willner, D.; Lasch, S. J.; Trail, P. A., Doxorubicin immunoconjugates containing bivalent, lysosomally-cleavable dipeptide linkages. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, *12*, 1529.
- (108) Lattuada, L.; Gabellini, M., Straightforward synthesis of a novel maleimide-DTPA bifunctional chelating agent. *Synth. Commun.*, **2005**, *35*, 2409.
- (109) Brechbiel, M. W.; Xu, H.; Baidoo, K. E.; Wong, K. J., A novel bifunctional maleimido CHX-A " chelator for conjugation to thiol-containing biomolecules. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 2679.
- (110) Schlick, T. L.; Ding, Z. B.; Kovacs, E. W.; Francis, M. B., Dual-surface modification of the tobacco mosaic virus. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 3718.
- (111) Hooker, J. M.; Kovacs, E. W.; Francis, M. B., Interior surface modification of bacteriophage MS2. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 3718.
- (112) Holder, P. G.; Francis, M. B., Integration of a self-assembling protein scaffold with water-soluble single-walled carbon nanotubes. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2007**, *46*, 4370.
- (113) Joshi, N. S.; Whitaker, L. R.; Francis, M. B., A Three-Component Mannich-Type Reaction for Selective Tyrosine Bioconjugation. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 15942.
- (114) Romanini, D. W.; Francis, M. B., Attachment of Peptide Building Blocks to Proteins Through Tyrosine Bioconjugation. *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 153.
- (115) McFarland, J. M.; Joshi, N. S.; Francis, M. B., Characterization of a Three-Component Coupling Reaction on Proteins by Isotopic Labeling and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 7639.
- (116) Ban, H.; Gavriilyuk, J.; Barbas, C. F., Tyrosine Bioconjugation through Aqueous Ene-Type Reactions: A Click-Like Reaction for Tyrosine. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 1523.
- (117) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R., Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2009**, *48*, 6974.
- (118) Speers, A. E.; Adam, G. C.; Cravatt, B. F., Activity-based protein profiling in vivo using a copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 4686.
- (119) Link, A. J.; Vink, M. K. S.; Tirrell, D. A., Presentation and detection of azide functionality in bacterial cell surface proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 10598.
- (120) Agard, N. J.; Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Lo, A.; Bertozzi, C. R., A comparative study of bioorthogonal reactions with azides. *ACS Chem. Biol.*, **2006**, *1*, 644.
- (121) Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R., Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2007**, *104*, 16793.
- (122) 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.*, **2008**, *130*, 11486.

- (123) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R., A Hydrophilic Azacyclooctyne for Cu-Free Click Chemistry. *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 3097.
- (124) Devaraj, N. K.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A., Tetrazine-Based Cycloadditions: Application to Pretargeted Live Cell Imaging. *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 2297.
- (125) Karver, M.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A., Synthesis and Evaluation of a Series of 1,2,4,5-Tetrazines for Bioorthogonal Conjugation. *Bioconjugate Chem.*, **2011**, Article ASAP.
- (126) Zeglis, B. M.; Mohindra, P.; Weissmann, G. I.; Divilov, V.; Hilderbrand, S. A.; Weissleder, R.; Lewis, J. S., A Modular Strategy for the Construction of Radiometallated Antibodies for Positron Emission Tomography Based on Inverse Electron Demand Diels-Alder Click Chemistry. *Bioconjugate Chem.*, **2011**, 2048.
- (127) Harris, W. R.; Chen, Y.; Wein, K., Equilibrium Constants for the Binding of Indium(III) to Human Serum Transferrin. *Inorg. Chem.*, **1994**, *33*, 4991.
- (128) Harris, W. R.; Messori, L., A comparative study of aluminum(III), gallium(III), indium(III), and thallium(III) binding to human serum transferrin. *Coord. Chem. Rev.*, **2002**, *228*, 237.
- (129) Green, M. A.; Welch, M. J.; Mathias, C. J.; Taylor, P.; Martell, A. E., Evaluation of PLED as a chelating ligand for the preparation of gallium and indium radiopharmaceuticals. *Int. J. Nucl. Med. Biol.*, **1985**, *12*, 381.
- (130) Smith, A. M.; Martell, A. E., *Critical Stability Constants*, **1985**, 1-6.
- (131) Harris, W. R.; Pecoraro, V. L., Thermodynamic binding constants for gallium transferrin. *Biochemistry*, **1983**, *22*, 292.
- (132) Maecke, H. R.; Riesen, A.; Ritter, W., The Molecular Structure of Indium-DTPA. *J. Nucl. Med.*, **1989**, *30*, 1235.
- (133) Safavy, A.; Smith, D. C.; Bazooband, A.; Buchsbaum, D. J., De Novo Synthesis of a New Diethylenetriaminepentaacetic Acid (DTPA) Bifunctional Chelating Agent. *Bioconjugate Chem.*, **2002**, *13*, 317.
- (134) Sabbah, E. N.; Kadouche, J.; Ellison, D.; Finucane, C.; Decaudin, D.; Mather, S. J., In vitro and in vivo comparison of DTPA- and DOTA-conjugated antiferritin monoclonal antibody for imaging and therapy of pancreatic cancer. *Nucl Med Biol*, **2007**, *34*, 293.
- (135) Nayak, T. K.; Regino, C. A. S.; Wong, K. J.; Milenic, D. E.; Garmestani, K.; Baidoo, K. E.; Szajek, L. P.; Brechbiel, M. W., PET imaging of HER1-expressing xenografts in mice with (86)Y-CHX-AaEuro(3)-DTPA-cetuximab. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2010**, *37*, 1368.
- (136) Cocolios, P.; Guillard, R.; Gros, C., WO9611189A1, **1996**.
- (137) Guillard, R.; Chollet, H.; Guiberteau, P.; Cocolios, P., WO9611056A1, **1996**.
- (138) Timmons, J. C.; Hubin, T. J., Preparations and applications of synthetic linked azamacrocyclic ligands and complexes. *Coord. Chem. Rev.*, **2010**, *254*, 1661.
- (139) Lattuada, L.; Barge, A.; Cravotto, G.; Giovenzana, G. B.; Tei, L., The synthesis and application of polyamino polycarboxylic bifunctional chelating agents. *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 3019.
- (140) Camera, L.; Kinuya, S.; Garmestani, K.; Wu, C. C.; Brechbiel, M. W.; Pai, L. H.; McMurry, T. J.; Gansow, O. A.; Pastan, I.; Paik, C. H.; Carrasquillo, J. A., Evaluation of the Serum Stability and in-Vivo Biodistribution of Chx-Dtpa and Other Ligands for Yttrium Labeling of Monoclonal-Antibodies. *J. Nucl. Med.*, **1994**, *35*, 882.

- (141) Cutler, C. S.; Smith, C. J.; Ehrhardt, G. J.; Tyler, T. T.; Jurisson, S. S.; Deutsch, E., Current and potential therapeutic uses of lanthanide radioisotopes. *Cancer Biother. Radiopharm.*, **2000**, *15*, 531.
- (142) Cabbiness, D. K.; Margerum, D. W., Macrocyclic effect on the stability of copper(II) tetramine complexes. *J. Am. Chem. Soc.*, **1969**, *91*, 6540.
- (143) Billo, E. J., Kinetics of dissociation and isomerization of cis-Ni([14]aneN4)(H₂O)₂²⁺ in aqueous perchloric acid solutions. *Inorg. Chem.*, **1984**, *23*, 236.
- (144) Hermann, P.; Kotek, J.; Kubicek, V.; Lukes, I., Gadolinium(III) complexes as MRI contrast agents: ligand design and properties of the complexes. *Dalton Trans.*, **2008**, 3027.
- (145) Clarke, E. T.; Martell, A. E., Stabilities of the Fe(III), Ga(III) and In(III) Chelates of N,N',N''-Triazacyclononanetriacetic Acid. *Inorg. Chim. Acta*, **1991**, *181*, 273.
- (146) Wadas, T. J.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Anderson, C. J., Coordinating Radiometals of Copper, Gallium, Indium, Yttrium, and Zirconium for PET and SPECT Imaging of Disease. *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 2858.
- (147) Clarke, E. T.; Martell, A. E., Stabilities of Trivalent Metal-Ion Complexes of the Tetraacetate Derivatives of 12-Membered, 13-Membered and 14-Membered Tetraazamacrocycles. *Inorg. Chim. Acta*, **1991**, *190*, 37.
- (148) Martell, A. E.; Motekaitis, R. J.; Clarke, E. T.; Delgado, R.; Sun, Y.; Ma, R., Stability constants of metal complexes of macrocyclic ligands with pendant donor groups. *Supramol. Chem.*, **1996**, *6*, 353.
- (149) Liu, S.; He, Z.; Hsieh, W.-Y.; Fanwick, P. E., Synthesis, Characterization, and X-ray Crystal Structure of In(DOTA-AA) (AA = p-Aminoanilide): A Model for ¹¹¹In-Labeled DOTA-Biomolecule Conjugates. *Inorg. Chem.*, **2003**, *42*, 8831.
- (150) Riesen, A.; Kaden, T. A.; Ritter, W.; Maecke, H. R., Synthesis and x-ray structural characterization of seven-coordinate macrocyclic indium(3+) complexes with relevance to radiopharmaceutical applications. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1989**, 460.
- (151) Delgado, R.; Sun, Y.; Motekaitis, R. J.; Martell, A. E., Stabilities of divalent and trivalent metal ion complexes of macrocyclic triazatriacetic acids. *Inorg. Chem.*, **1993**, *32*, 3320.
- (152) Broan, C.; Cox, J. P.; Craig, A. S.; Katakly, R.; Parker, D.; Harrison, A.; Randall, A. M.; Ferguson, G., Structure and solution stability of indium and gallium complexes of 1,4,7-triazacyclononanetriacetate and of yttrium complexes of 1,4,7,10-tetraazacyclododecanetetraacetate and related ligands: kinetically stable complexes for use in imaging and radioimmunotherapy. X-ray molecular structure of the indium and gallium complexes of 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1991**, 87.
- (153) Heppeler, A.; Froidevaux, S.; Maecke, H. R.; Jermann, E.; Behe, M.; Powell, P.; Hennig, M., Radiometal-labelled macrocyclic chelator-derivatized somatostatin analogue with superb tumour-targeting properties and potential for receptor-mediated internal radiotherapy. *Chem. Eur. J.*, **1999**, *5*, 1974.
- (154) Tolmachev, V.; Altai, M.; Sandstrom, M.; Perols, A.; Karlstrom, A. E.; Boschetti, F.; Orlova, A., Evaluation of a Maleimido Derivative of NOTA for Site-Specific Labeling of Affibody Molecules. *Bioconjugate Chem.*, **2011**, *22*, 894.
- (155) Ma, R.; Welch, M. J.; Reibenspies, J.; Martell, A. E., Stability of metal ion complexes of 1,4,7-tris(2-mercaptoethyl)-1,4,7-triazacyclononane (TACN-TM) and molecular structure of In(C₁₂H₂₄N₃S₃). *Inorg. Chim. Acta*, **1995**, *236*, 75.

- (156) Forsterova, M.; Petrik, M.; Laznickova, A.; Laznicek, M.; Hermann, P.; Lukes, I.; Melichar, F., Complexation and biodistribution study of ^{111}In and ^{90}Y complexes of bifunctional phosphinic acid analogs of H4dota. *Appl. Radiat. Isot.*, **2009**, *67*, 21.
- (157) Boschetti, F., *Thèse de l'Université de Bourgogne*, **2003**.
- (158) Boschetti, F.; Denat, F.; Guillard, R.; Ledon, H., FR2830253A1, **2003**.
- (159) Rousselin, Y.; Sok, N.; Boschetti, F.; Guillard, R.; Denat, F., Efficient synthesis of new C-functionalized macrocyclic polyamines. *Eur. J. Org. Chem.*, **2010**, 1688.
- (160) Herve, G.; Bernard, H.; Le Bris, N.; Le Baccon, M.; Yaouanc, J.-J.; Handel, H., Condensation of glyoxal with triethylenetetraamine. Stereochemistry, cyclization and deprotection. *Tetrahedron Lett.*, **1999**, *40*, 2517.
- (161) Chuburu, F.; Tripier, R.; Le Baccon, M.; Handel, H., Bis-aminals of linear tetraamines: Kinetic and thermodynamic aspects of the condensation reaction. *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 1050.
- (162) Boschetti, F.; Denat, F.; Espinosa, E.; Lagrange, J.-M.; Guillard, R., A powerful route to C-functionalized tetraazamacrocycles. *Chem. Commun.*, **2004**, 588.
- (163) Brandes, S.; Gros, C.; Denat, F.; Pullumbi, P.; Guillard, R., New facile and convenient synthesis of bispolyazamacrocycles using Boc protection. Determination of geometric parameters of dinuclear copper(II) complexes using ESR spectroscopy and molecular mechanics calculations. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1996**, *133*, 65.
- (164) Kimura, E.; Aoki, S.; Koike, T.; Shiro, M., A Tris(zinc-1,4,7,10-tetraazacyclododecane) Complex as a New Receptor for Phosphate Dianions in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 3068.
- (165) Denat, F.; Brandes, S.; Guillard, R., Strategies for the regioselective N-functionalization of tetraazacycloalkanes. From cyclam and cyclen towards more sophisticated molecules. *Synlett*, **2000**, 561.
- (166) Jazwinski, J.; Kolinski, R. A., Tricyclic tetraamines by glyoxal-linear tetraamine condensation. *Tetrahedron Lett.*, **1981**, *22*, 1711.
- (167) Herve, G.; Bernard, H.; Le Bris, N.; Yaouanc, J.-J.; Handel, H.; Toupet, L., A new route to cyclen, cyclam and homocyclen. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 6861.
- (168) Weisman, G. R.; Ho, S. C. H.; Johnson, V., Tetracyclic tetraamines by glyoxal-macrocyclic tetraamine condensation. *Tetrahedron Lett.*, **1980**, *21*, 335.
- (169) Herve, G.; Bernard, H.; Toupet, L.; Handel, H., Condensation of glyoxal with triethylenetetraamine; isomerization and cyclization. *Eur. J. Org. Chem.*, **2000**, 33.
- (170) Boschetti, F.; Chaux, F.; Denat, F.; Guillard, R.; Ledon, H., FR2856063A1, **2004**.
- (171) Richman, J. E.; Atkins, T. J., Nitrogen analogs of crown ethers. *J. Am. Chem. Soc.*, **1974**, *96*, 2268.
- (172) Tabushi, I.; Taniguchi, Y.; Kato, H., Preparation of C-alkylated macrocyclic polyamines. *Tetrahedron Lett.*, **1977**, 1049.
- (173) Liu, S.; Edwards, D. S., Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals. *Bioconjugate Chem.*, **2001**, *12*, 7.
- (174) McMurry, T. J.; Brechbiel, M.; Wu, C.; Gansow, O. A., Synthesis of 2-(p-thiocyanatobenzyl)-1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid: Application of the 4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulfonamide protecting group in the synthesis of macrocyclic polyamines. *Bioconjugate Chem.*, **1993**, *4*, 236.

- (175) Pulukkody, K. P.; Norman, T. J.; Parker, D.; Royle, L.; Broan, C. J., Synthesis of charged and uncharged complexes of gadolinium and yttrium with cyclic polyazaphosphinic acid ligands for in vivo applications. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1993**, 605.
- (176) Lewis, E. A.; Boyle, R. W.; Archibald, S. J., Ultrastable complexes for in vivo use: a bifunctional chelator incorporating a cross-bridged macrocycle. *Chem. Commun.*, **2004**, 2212.
- (177) Barge, A.; Tei, L.; Upadhyaya, D.; Fedeli, F.; Beltrami, L.; Stefania, R.; Aime, S.; Cravotto, G., Bifunctional ligands based on the DOTA-monoamide cage. *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, *6*, 1176.
- (178) Boswell, C. A.; Regino, C. A. S.; Baidoo, K. E.; Wong, K. J.; Bumb, A.; Xu, H.; Milenic, D. E.; Kelley, J. A.; Lai, C. C.; Brechbiel, M. W., Synthesis of a Cross-Bridged Cyclam Derivative for Peptide Conjugation and ^{64}Cu Radiolabeling. *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 1476.
- (179) Riss, P. J.; Kroll, C.; Nagel, V.; Roesch, F., NODAPA-OH and NODAPA-(NCS) $_n$: Synthesis, ^{68}Ga -radiolabelling and in vitro characterisation of novel versatile bifunctional chelators for molecular imaging. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 5364.
- (180) Liu, W.; Hao, G.; Long, M. A.; Anthony, T.; Hsieh, J.-T.; Sun, X., Imparting Multivalency to a Bifunctional Chelator: A Scaffold Design for Targeted PET Imaging Probes. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2009**, *48*, 7346.
- (181) Cai, W. B.; Chen, K.; He, L. N.; Cao, Q. H.; Koong, A.; Chen, X. Y., Quantitative PET of EGFR expression in xenograft-bearing mice using Cu-64-labeled cetuximab, a chimeric anti-EGFR monoclonal antibody. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2007**, *34*, 850.
- (182) Rasaneh, S.; Rajabi, H.; Babaei, M. H.; Daha, F. J.; Salouti, M., Radiolabeling of trastuzumab with (^{177}Lu) via DOTA, a new radiopharmaceutical for radioimmunotherapy of breast cancer. *Nucl. Med. Biol.*, **2009**, *36*, 363.
- (183) Chong, H. S.; Song, H. A.; Kang, C. S.; Baidoo, K. E.; Milenic, D. E.; Chen, Y. W.; Dai, A. Z.; Brechbiel, M. W., Efficient Bifunctional Decadentate Ligand 3p-C-DEPA for Targeted alpha-Radioimmunotherapy Applications. *Bioconjugate Chem.*, **2011**, *22*, 1128.
- (184) Albert, R.; Smith-Jones, P.; Stolz, B.; Simeon, C.; Knecht, H.; Bruns, C.; Pless, J., Direct synthesis of [DOTA-DPhe 1]-octreotide and [DOTA-DPhe 1 ,Tyr 3]-octreotide (SMT487): two conjugates for systemic delivery of radiotherapeutical nuclides to somatostatin receptor positive tumors in man. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, *8*, 1207.
- (185) De Leon-Rodriguez, L. M.; Kovacs, Z.; Dieckmann, G. R.; Sherry, A. D., Solid-phase synthesis of DOTA-peptides. *Chem. Eur. J.*, **2004**, *10*, 1149.
- (186) Tolmachev, V.; Orlova, A.; Tran, T.; Widstrom, C.; Engfeldt, T.; Karlstrom, A. E., Pre-clinical evaluation of [^{111}In]-benzyl-DOTA-Z(HER2 : 3429) a potential agent for imaging of HER2 expression in malignant tumors. *Int. J. Mol. Med.*, **2007**, *20*, 397.
- (187) Tran, T. A.; Rosik, D.; Abrahmsen, L.; Sandstrom, M.; Sjoberg, A.; Wallberg, H.; Ahlgren, S.; Orlova, A.; Tolmachev, V., Design, synthesis and biological evaluation of a multifunctional HER2-specific Affibody molecule for molecular imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2009**, *36*, 1864.
- (188) Hnatowich, D. J.; Layne, W. W.; Childs, R. L., The preparation and labeling of DTPA-coupled albumin. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, **1982**, *33*, 327.
- (189) Rowe, B. J.; Wallace, R. A.; White, D. H.; Kaspar, D. L., WO2007142804A2, **2007**.

- (190) Maecke, H. R.; Eisenwiener, K. P.; Powell, P., A convenient synthesis of novel bifunctional prochelators for coupling to bioactive peptides for radiometal labelling. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, *10*, 2133.
- (191) Botta, M.; Kielar, F.; Tei, L.; Terreno, E., Large Relaxivity Enhancement of Paramagnetic Lipid Nanoparticles by Restricting the Local Motions of the Gd(III) Chelates. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 7836.
- (192) Mayer, H. A.; Henig, J.; Toth, E.; Engelmann, J.; Gottschalk, S., Macrocyclic Gd(3+) Chelates Attached to a Silsesquioxane Core as Potential Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents: Synthesis, Physicochemical Characterization, and Stability Studies. *Inorg. Chem.*, **2010**, *49*, 6124.
- (193) Carniato, F.; Tei, L.; Cossi, M.; Marchese, L.; Botta, M., A Chemical Strategy for the Relaxivity Enhancement of GdIII Chelates Anchored on Mesoporous Silica Nanoparticles. *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, 10727.
- (194) Frullano, L.; Catana, C.; Benner, T.; Sherry, A. D.; Caravan, P., Bimodal MR-PET Agent for Quantitative pH Imaging. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2010**, *49*, 2382.
- (195) Cordier, D.; Forrer, F.; Kneifel, S.; Sailer, M.; Mariani, L.; Maecke, H.; Muller-Brand, J.; Merlo, A., Neoadjuvant targeting of glioblastoma multiforme with radiolabeled DOTAGA-substance P-results from a phase I study. *J. Neurooncol.*, **2010**, *100*, 129.
- (196) Stephenson, K. A.; Zubieta, J.; Banerjee, S. R.; Levadala, M. K.; Taggart, L.; Ryan, L.; McFarlane, N.; Boreham, D. R.; Maresca, K. P.; Babich, J. W.; Valliant, J. F., A New Strategy for the Preparation of Peptide-Targeted Radiopharmaceuticals Based on an Fmoc-Lysine-Derived Single Amino Acid Chelate (SAAC). Automated Solid-Phase Synthesis, NMR Characterization, and in Vitro Screening of fMLF(SAAC)G and fMLF[(SAAC-Re(CO)3)+]G. *Bioconjugate Chem.*, **2004**, *15*, 128.
- (197) Culver, J.; Akers, W.; Achilefu, S., Multimodality molecular imaging with combined optical and SPECT/PET modalities. *J. Nucl. Med.*, **2008**, *49*, 169.
- (198) Jennings, L. E.; Long, N. J., 'Two is better than one' - probes for dual-modality molecular imaging. *Chem. Commun.*, **2009**, 3511.
- (199) Gao, J.; Chen, X.; Cheng, Z., Near-infrared quantum dots as optical probes for tumor imaging. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2010**, *10*, 1147.
- (200) Noga, E. J.; Udomkunsri, P., Fluorescein: a rapid, sensitive, nonlethal method for detecting skin ulceration in fish. *Vet. Pathol.*, **2002**, *39*, 726.
- (201) Heger, M.; Salles, I. I.; van Vuure, W.; Deckmyn, H.; Beek, J. F., Fluorescent labeling of platelets with polyanionic fluorescein derivatives. *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, **2009**, *31*, 227.
- (202) Takeda, A.; Baffi, J. Z.; Kleinman, M. E.; Cho, W. G.; Nozaki, M.; Yamada, K.; Kaneko, H.; Albuquerque, R. J. C.; Dridi, S.; Saito, K.; Raisler, B. J.; Budd, S. J.; Geisen, P.; Munitz, A.; Ambati, B. K.; Green, M. G.; Ishibashi, T.; Wright, J. D.; Humbles, A. A.; Gerard, C. J.; Ogura, Y.; Pan, Y.; Smith, J. R.; Grisanti, S.; Hartnett, M. E.; Rothenberg, M. E.; Ambati, J., CCR3 is a target for age-related macular degeneration diagnosis and therapy. *Nature*, **2009**, *460*, 225.
- (203) Kunkel, E. J.; Boisvert, J.; Murphy, K.; Vierra, M. A.; Genovese, M. C.; Wardlaw, A. J.; Greenberg, H. B.; Hodge, M. R.; Wu, L.; Butcher, E. C.; Campbell, J. J., Expression of the chemokine receptors CCR4, CCR5, and CXCR3 by human tissue-infiltrating lymphocytes. *Am. J. Pathol.*, **2002**, *160*, 347.

- (204) Facciabene, A.; Peng, X.; Hagemann, I. S.; Balint, K.; Barchetti, A.; Wang, L.-P.; Gimotty, P. A.; Gilks, C. B.; Lal, P.; Zhang, L.; Coukos, G., Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and Treg cells. *Nature*, **2011**, *475*, 226.
- (205) Lyon, R.; Zebala, J. A., US20080269065A1, **2008**.
- (206) Jullian, M.; Hernandez, A.; Maurras, A.; Puget, K.; Amblard, M.; Martinez, J.; Subra, G., N-terminus FITC labeling of peptides on solid support: the truth behind the spacer. *Tetrahedron Lett.*, **2009**, *50*, 260.
- (207) Gao, Q., CN101270124A, **2008**.
- (208) Bydlinski, G.; Harris, G. R.; Scott, B. S., WO2008073764A2, **2008**.
- (209) Erixon, K. M.; Dabalos, C. L.; Leeper, F. J., Synthesis and biological evaluation of pyrophosphate mimics of thiamine pyrophosphate based on a triazole scaffold. *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, *6*, 3561.
- (210) Halim, D.; Caron, K.; Keillor, J. W., Synthesis and evaluation of peptidic maleimides as transglutaminase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 305.
- (211) Lux, F.; Mignot, A.; Mowat, P.; Louis, C.; Dufort, S.; Bernhard, C.; Denat, F.; Boschetti, F.; Brunet, C.; Antoine, R.; Dugourd, P.; Laurent, S.; Elst, L. V.; Muller, R.; Sancey, L.; Jossierand, V.; Coll, J.-L.; Stupar, V.; Barbier, E.; Remy, C.; Broisat, A.; Ghezzi, C.; Le, D. G.; Roux, S.; Perriat, P.; Tillement, O., Ultrasmall Rigid Particles as Multimodal Probes for Medical Applications. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2011**, *50*, 12299.
- (212) Siegel, M. M.; Hollander, I. J.; Hamann, P. R.; James, J. P.; Hinman, L.; Smith, B. J.; Farnsworth, A. P. H.; Phipps, A.; King, D. J., Matrix-assisted UV-laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of monoclonal antibodies for the determination of carbohydrate, conjugated chelator, and conjugated drug content. *Anal. Chem.*, **1991**, *63*, 2470.
- (213) Ashton, D. S.; Beddell, C. R.; Cooper, D. J.; Craig, S. J.; Lines, A. C.; Oliver, R. W. A.; Smith, M. A., Mass Spectrometry of the Humanized Monoclonal Antibody Campath 1H. *Anal. Chem.*, **1995**, *67*, 835.
- (214) Hayes, D. F.; Thor, A. D.; Dressler, L. G.; Weaver, D.; Edgerton, S.; Cowan, D.; Broadwater, G.; Goldstein, L. J.; Martino, S.; Ingle, J. N.; Henderson, I. C.; Norton, L.; Winer, E. P.; Hudis, C. A.; Ellis, M. J.; Berry, D. A.; George, S.; Crawford, J.; Ernstoff, M. S.; Citron, M.; Grossbard, M. I.; Green, M.; Silverman, L. R.; Budman, D. R.; Sikov, W.; Levine, E.; Graziano, S. L.; Diasio, R.; Mortimer, J.; Venook, A. P.; Fleming, G.; Feldman, L. E.; Clamon, G.; Edelman, M.; Peterson, B. A.; Perry, M. C.; Kessinger, A.; Shea, T. C.; Niell, H. B.; Muss, H. B.; Hurd, D. D.; Reid, T.; Bartlett, N.; Wadler, S., HER2 and response to paclitaxel in node-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, **2007**, *357*, 1496.
- (215) Moasser, M. M., The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*, **2007**, *26*, 6469.
- (216) Baselga, J.; Albanell, J., Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies. *Ann. Oncol.*, **2001**, *12*, S35.
- (217) Desmedt, C.; Sperinde, J.; Piette, F.; Huang, W.; Jin, X.; Tan, Y.; Durbecq, V.; Larsimont, D.; Giuliani, R.; Chappey, C.; Buyse, M.; Winslow, J.; Piccart, M.; Sotiriou, C.; Petropoulos, C.; Bates, M., Quantitation of HER2 Expression or HER2:HER2 Dimers and Differential Survival in a Cohort of Metastatic Breast Cancer Patients Carefully Selected for Trastuzumab Treatment Primarily by FISH. *Diagn. Mol. Pathol.*, **2009**, *18*, 22.

- (218) Gupta, D.; Middleton, L. P.; Whitaker, M. J.; Abrams, J., Comparison of fluorescence and chromogenic in situ hybridization for detection of HER-2/neu oncogene in breast cancer. *Am. J. Clin. Pathol.*, **2003**, *119*, 381.
- (219) Phillips, K. A.; Marshall, D. A.; Haas, J. S.; Elkin, E. B.; Liang, S.-Y.; Hassett, M. J.; Ferrusi, I.; Brock, J. E.; Van Bebbber, S. L., Clinical practice patterns and cost effectiveness of human epidermal growth receptor 2 testing strategies in breast cancer patients. *Cancer*, **2009**, *115*, 5166.
- (220) Allison, M., The HER2 testing conundrum. *Nat. Biotechnol.*, **2010**, *28*, 117.
- (221) Allred, D. C., Issues and updates: evaluating estrogen receptor- α , progesterone receptor, and HER2 in breast cancer. *Mod. Pathol.*, **2010**, *23*, S52.
- (222) Santinelli, A.; Pisa, E.; Stramazzotti, D.; Fabris, G., HER-2 status discrepancy between primary breast cancer and metastatic sites. Impact on target therapy. *Int. J. Cancer*, **2008**, *122*, 999.
- (223) Krawczyk, N.; Banys, M.; Neubauer, H.; Solomayer, E.-F.; Gall, C.; Hahn, M.; Becker, S.; Bachmann, R.; Wallwiener, D.; Fehm, T., HER2 status on persistent disseminated tumor cells after adjuvant therapy may differ from initial HER2 status on primary tumor. *Anticancer Res.*, **2009**, *29*, 4019.
- (224) Perik, P. J.; Lub-de Hooge, M. N.; Gietema, J. A.; Van der Graaf, W. T. A.; De Korte, M. A.; Jonkman, S.; Kosterink, J. G. W.; Van Veldhuisen, D. J.; Sleijfer, D. T.; Jager, P. L.; De Vries, E. G. E., Indium-111-labeled trastuzumab scintigraphy in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, **2006**, *24*, 2276.
- (225) Ferreira, C. L.; Yapp, D. T. T.; Crisp, S.; Sutherland, B. W.; Ng, S. S. W.; Gleave, M.; Bensimon, C.; Jurek, P.; Kiefer, G. E., Comparison of bifunctional chelates for (64)Cu antibody imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2010**, *37*, 2117.
- (226) Sahu, S. K.; Kassis, A. I.; Makrigiorgos, G. M.; Baranowska-Kortylewicz, J.; Adelstein, S. J., The effects of indium-111 decay on pBR322 DNA. *Radiat. Res.*, **1995**, *141*, 193.
- (227) Alvarez, J.; Arriaga, C., Contradictions observed in labeling with indium. *J. Radioanal. Chem.*, **1978**, *43*, 295.
- (228) Valenzano, K. J.; Miller, W.; Kravitz, J. N.; Samama, P.; Fitzpatrick, D.; Seeley, K., Development of a Fluorescent Ligand-Binding Assay Using the AcroWell Filter Plate. *J. Biomol. Screen.*, **2000**, *5*, 455.
- (229) McLarty, K.; Cornelissen, B.; Scollard, D. A.; Done, S. J.; Chun, K.; Reilly, R. M., Associations between the uptake of 111In-DTPA-trastuzumab, HER2 density and response to trastuzumab (Herceptin) in athymic mice bearing subcutaneous human tumour xenografts. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2009**, *36*, 81.
- (230) Luo, T.-Y.; Tang, I. C.; Wu, Y.-L.; Hsu, K.-L.; Liu, S.-W.; Kung, H.-C.; Lai, P.-S.; Lin, W.-J., Evaluating the potential of 188Re-SOCTA-trastuzumab as a new radioimmunoagent for breast cancer treatment. *Nucl. Med. Biol.*, **2009**, *36*, 81.
- (231) Harari, P. M., Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr. Relat. Cancer*, **2004**, *11*, 689.
- (232) Mendelsohn, J.; Baselga, J., Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Semin. Oncol.*, **2006**, *33*, 369.
- (233) Capdevila, J.; Elez, E.; Macarulla, T.; Ramos, F. J.; Ruiz-Echarri, M.; Tabernero, J., Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer treatment. *Cancer Treat. Rev.*, **2009**, *35*, 354.

- (234) Xiong, H. O.; Rosenberg, A.; LoBuglio, A.; Schmidt, W.; Wolff, R. A.; Deutsch, J.; Needle, M.; Abbruzzese, J. L., Cetuximab, a monoclonal antibody targeting the epidermal growth factor receptor, in combination with gemcitabine for advanced pancreatic cancer: a multicenter phase II trial. *J. Clin. Oncol.*, **2004**, *22*, 2610.
- (235) Thienelt, C. D.; Bunn, P. A., Jr.; Hanna, N.; Rosenberg, A.; Needle, M. N.; Long, M. E.; Gustafson, D. L.; Kelly, K., Multicenter phase I/II study of cetuximab with paclitaxel and carboplatin in untreated patients with stage IV non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, **2005**, *23*, 8786.
- (236) Bonner, J. A.; Harari, P. M.; Giralt, J.; Azarnia, N.; Shin, D. M.; Cohen, R. B.; Jones, C. U.; Sur, R.; Raben, D.; Jassem, J.; Ove, R.; Kies, M. S.; Baselga, J.; Youssoufian, H.; Amellal, N.; Rowinsky, E. K.; Ang, K. K., Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N. Engl. J. Med.*, **2006**, *354*, 567.
- (237) Frieze, D. A.; McCune, J. S., Current status of cetuximab for the treatment of patients with solid tumors. *Ann. Pharmacother.*, **2006**, *40*, 241.
- (238) Personeni, N.; Fieuws, S.; Piessevaux, H.; De, H. G.; De, S. J.; Biesmans, B.; De, R. W.; Capoen, A.; Debiec-Rychter, M.; Van, L. J.-L.; Peeters, M.; Humblet, Y.; Van, C. E.; Tejpar, S., Clinical Usefulness of EGFR Gene Copy Number as a Predictive Marker in Colorectal Cancer Patients Treated with Cetuximab: A Fluorescent In situ Hybridization Study. *Clin. Cancer Res.*, **2008**, *14*, 5869.
- (239) Loupakis, F.; Pollina, L.; Stasi, I.; Ruzzo, A.; Scartozzi, M.; Santini, D.; Masi, G.; Graziano, F.; Cremolini, C.; Rulli, E.; Canestrari, E.; Funel, N.; Schiavon, G.; Petrini, I.; Magnani, M.; Tonini, G.; Campani, D.; Floriani, I.; Cascinu, S.; Falcone, A., PTEN expression and KRAS mutations on primary tumors and metastases in the prediction of benefit from cetuximab plus irinotecan for patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.*, **2009**, *27*, 2622.
- (240) Perk, L. R.; Visser, G. W. M.; Vosjan, M. J. W. D.; Stigter-van Walsum, M.; Tijink, B. M.; Leemans, C. R.; van Dongen, G. A. M. S., ⁸⁹Zr as a PET surrogate radioisotope for scouting biodistribution of the therapeutic radiometals ⁹⁰Y and ¹⁷⁷Lu in tumor-bearing nude mice after coupling to the internalizing antibody cetuximab. *J. Nucl. Med.*, **2005**, *46*, 1898.
- (241) Eiblmaier, M.; Meyer, L. A.; Watson, M. A.; Fracasso, P. M.; Pike, L. J.; Anderson, C. J., Correlating EGFR expression with receptor-binding properties and internalization of ⁶⁴Cu-DOTA-cetuximab in 5 cervical cancer cell lines. *J. Nucl. Med.*, **2008**, *49*, 1472.
- (242) Nayak, T. K.; Garmestani, K.; Milenic, D. E.; Baidoo, K. E.; Brechbiel, M. W., HER1-targeted ⁸⁶Y-panitumumab possesses superior targeting characteristics than ⁸⁶Y-cetuximab for PET imaging of human malignant mesothelioma tumors xenografts. *PLoS One*, **2011**, *6*, e18198.
- (243) Nestor, M., Effect of cetuximab treatment in squamous cell carcinomas. *Tumor Biol.*, **2010**, *31*, 141.
- (244) Meira, D. D.; Nobrega, I.; de, A. V. H.; Mororo, J. S.; Cardoso, A. M.; Silva, R. L. A.; Albano, R. M.; Ferreira, C. G., Different antiproliferative effects of matuzumab and cetuximab in A431 cells are associated with persistent activity of the MAPK pathway. *Eur. J. Cancer*, **2009**, *45*, 1265.
- (245) Li, S.; Schmitz, K. R.; Jeffrey, P. D.; Wiltzius, J. J. W.; Kussie, P.; Ferguson, K. M., Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell*, **2005**, *7*, 301.

- (246) Alonso, A.; Della Martina, A.; Stroick, M.; Fatar, M.; Griebbe, M.; Pochon, S.; Schneider, M.; Hennerici, M.; Allémann, E.; Meairs, S., Molecular Imaging of Human Thrombus With Novel Abciximab Immunobubbles and Ultrasound. *Stroke*, **2007**, *38*, 1508.
- (247) Della Martina, A.; Allemann, E.; Bettinger, T.; Bussat, P.; Lassus, A.; Pochon, S.; Schneider, M., Grafting of abciximab to a microbubble-based ultrasound contrast agent for targeting to platelets expressing GP IIb/IIIa - Characterization and in vitro testing. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2008**, *68*, 555.
- (248) Polack, B.; Schved, J.-F.; Boneu, B., Preanalytical recommendations of the "Groupe d'Etude sur l'Hémostase et la Thrombose" (GEHT) for venous blood testing in hemostasis laboratories. *Haemostasis*, **2001**, *31*, 61.
- (249) Favalaro, E. J.; Lippi, G.; Franchini, M., Contemporary platelet function testing. *Clin. Chem. Lab. Med.*, **2010**, *48*, 579.
- (250) Dixon, H. B. F.; Perham, R. N., Reversible blocking of amino groups with citraconic anhydride. *Biochem. J.*, **1968**, *109*, 312.
- (251) Hézar, N.; Metz, D.; Nazeyrollas, P.; Nguyen, P.; Simon, G.; Daliphard, S.; Droullé, C.; Elaerts, J.; Potron, G., Free and total platelet glycoprotein IIb/IIIa measurement in whole blood by quantitative flow cytometry during and after infusion of c7E3 Fab in patients undergoing PTCA. *Thromb. Haemost.*, **1999**, *81*, 869.
- (252) Quinn, M. J.; Murphy, R. T.; Dooley, M.; Foley, J. B.; Fitzgerald, D. J., Occupancy of the Internal and External Pools of Glycoprotein IIb/IIIa following Abciximab Bolus and Infusion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2001**, *297*, 496.
- (253) Gautier, T.; Klein, A.; Deckert, V.; Desrumaux, C.; Ogier, N.; Sberna, A.-L.; Paul, C.; Le, G. N.; Athias, A.; Montange, T.; Monier, S.; Piard, F.; Jiang, X.-C.; Masson, D.; Lagrost, L., Effect of Plasma Phospholipid Transfer Protein Deficiency on Lethal Endotoxemia in Mice. *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*, 18702.
- (254) Gautier, T.; Paul, C.; Deckert, V.; Desrumaux, C.; Klein, A.; Labbe, J.; Le, G. N.; Athias, A.; Monier, S.; Hammann, A.; Bettaieb, A.; Jeannin, J.-F.; Lagrost, L., Innate immune response triggered by triacyl lipid A is dependent on phospholipid transfer protein (PLTP) gene expression. *FASEB J.*, **2010**, *24*, 3544.
- (255) Gautier, T.; Lagrost, L., Plasma PLTP (phospholipid-transfer protein): an emerging role in reverse lipopolysaccharide transport' and innate immunity. *Biochem. Soc. Trans.*, **2011**, *39*, 984.
- (256) Trubetskoy, V. S.; Koshkina, N. V.; Omel'yanenko, V. G.; L'Vov V, L.; Dmitriev, B. A.; Petrov, A. B.; Torchilin, V. P., FITC-labeled lipopolysaccharide: use as a probe for liposomal membrane incorporation studies. *FEBS Lett.*, **1990**, *269*, 79.
- (257) Troelstra, A.; Antal-Szalmas, P.; de Graaf-Miltenburg, L. A. M.; Weersink, A. J. L.; Verhoef, J.; Van, K. K. P. M.; Van, S. J. A. G., Saturable CD14-dependent binding of fluorescein-labeled lipopolysaccharide to human monocytes. *Infect. Immun.*, **1997**, *65*, 2272.
- (258) Triantafilou, K.; Triantafilou, M.; Fernandez, N., Lipopolysaccharide (LPS) labeled with Alexa 488 hydrazide as a novel probe for LPS binding studies. *Cytometry*, **2000**, *41*, 316.
- (259) Fujimoto, Y.; Kimura, E.; Murata, S.; Kusumoto, S.; Fukase, K., Synthesis and bioactivity of fluorescence- and biotin-labeled lipid A analogs for investigation of recognition mechanism in innate immunity. *Tetrahedron Lett.*, **2006**, *47*, 539.
- (260) Rosenbaum, J. T.; Hendricks, P. A.; Shively, J. E.; McDougall, I. R., Distribution of radiolabeled endotoxin with particular reference to the eye: concise communication. *J. Nucl. Med.*, **1983**, *24*, 29.

- (261) Munford, R. S.; DeVeaux, L. C.; Cronan Jr, J. E.; Rick, P. D., Biosynthetic radiolabeling of bacterial lipopolysaccharide to high specific activity. *J. Immunol. Methods*, **1992**, *148*, 115.

COMMUNICATION DES RÉSULTATS

Publications

Voltammetric detection of Lead(II) using amide-cyclam-functionalized silica-modified carbon paste electrodes.

Stéphanie Goubert-Renaudin, Mathieu Moreau, Christelle Despas, Michel Meyer, Franck Denat, Bénédicte Lebeau, Alain Walcarius, *Electroanalysis*, **2009**, *21*, 1731.

DOTAGA-trastuzumab. A new conjugated antibody targeting HER2/neu antigen for diagnostic purposes.

Mathieu Moreau, Olivier Raguin, Jean-Marc Vrigneaud, Bertrand Collin, Claire Bernhard, Xavier Tizon, Frédéric Boschetti, Olivier Duchamp, François Brunotte, Franck Denat, Soumis *Bioconjugate Chem.*, **2012**, DOI : 10.1021/bc200680x.

DOTAGA-anhydride: a valuable building block for the preparation of DOTA-like chelating agents.

Claire Bernhard, Mathieu Moreau, Damien Lhenry, Christine Goze, Frédéric Boschetti, Yoann Rousselin, François Brunotte, Franck Denat, *Chem. Eur. J.*, **2012**, DOI : 10.1002/chem.201200132.

Communication orales

Nouvel immunoconjugué pour le diagnostique de cancers.

Mathieu Moreau, XII^{èmes} Journées des Écoles Doctorales Carnot et Pasteur, Dijon, 5-6 mai 2011.

Greffage de tétraamines macrocycliques sur un anticorps : l'abciximab.

Mathieu Moreau, Claire Bernhard, David Vandroux, Bertrand Collin, Emmanuel De Maistre, François Brunotte, Franck Denat, XVIII^{ème} Journée Jeunes Chercheurs de la Société de Chimie Thérapeutique, Paris, 4 février 2011.

Communication par affiche

New DOTA-Conjugated antibody for cancer diagnosis.

Mathieu Moreau, Olivier Raguin, Bertrand Collin, Jean-Marc Vrigneaud, Xavier Tizon, Jan Hoflack, Olivier Duchamp, Frédéric Boschetti, François Brunotte, Franck Denat, 6th European Molecular Imaging Meeting, Leiden, Hollande, 19-21 juin 2011.

DOTA-conjugated antibodies for scintigraphic evaluation of new anti-cancer treatments.

Olivier Raguin, Mathieu Moreau, Bertrand Collin, Jean-Marc Vrigneaud, Xavier Tizon, Jan Hoflack, Olivier Duchamp, Frédéric Boschetti, François Brunotte, Franck Denat, 102nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Orlando, Floride, 2-6 avril 2011.

Grafting of abciximab with macrocyclic tetraamines.

Mathieu Moreau, Claire Bernhard, David Vandroux, Bertrand Collin, Emmanuel De Maistre, François Brunotte, Franck Denat, I^{ères} Journées de Rencontres Franco-Tchèques Vltava de Chimie en Bourgogne, Dijon, 9-11 septembre 2010.

Greffage de tétraamines macrocycliques sur un anticorps : l'abciximab.

Mathieu Moreau, David Vandroux, Bertrand Collin, François Brunotte, Franck Denat, III^{èmes} journées de rencontres du GPOL (Groupe d'études en chimie des polyamines cycliques et linéaires), Orléans, 15 Juin 2010.

Greffage de tétraamines macrocycliques sur des anticorps.

Mathieu Moreau, XI^{èmes} Journées des Écoles Doctorales Carnot et Pasteur, Besançon, 6-7 mai 2010.

Greffage de tétraazamacrocycliques sur des anticorps.

Mathieu Moreau, Claire Bernhard, David Vandroux, Bertrand Collin, Emmanuel De Maistre, François Brunotte, Franck Denat, Journée Scientifique IFR100 Santé-STIC, Dijon, 13 avril 2011.