



**HAL**  
open science

**Radiomarquage, caractérisation et biodistribution de la complexation du  $^{99m}\text{Tc}$  par deux chélates déjà synthétisés comme sidérophores : O-trenox tris (8-hydroxy-quinoléine) et O-trenox tris (8-hydroxy-5-sulfonate-quinoléine)**

Alexandre Biguet Petit Jean

► **To cite this version:**

Alexandre Biguet Petit Jean. Radiomarquage, caractérisation et biodistribution de la complexation du  $^{99m}\text{Tc}$  par deux chélates déjà synthétisés comme sidérophores : O-trenox tris (8-hydroxy-quinoléine) et O-trenox tris (8-hydroxy-5-sulfonate-quinoléine). Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-03021885

**HAL Id: dumas-03021885**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03021885>**

Submitted on 24 Nov 2020

**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.

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance.

La propriété intellectuelle du document reste entièrement celle du ou des auteurs. Les utilisateurs doivent respecter le droit d'auteur selon la législation en vigueur, et sont soumis aux règles habituelles du bon usage, comme pour les publications sur papier : respect des travaux originaux, citation, interdiction du pillage intellectuel, etc.

Il est mis à disposition de toute personne intéressée par l'intermédiaire de [l'archive ouverte DUMAS](#) (Dépôt Universitaire de Mémoires Après Soutenance).

Si vous désirez contacter son ou ses auteurs, nous vous invitons à consulter la page de DUMAS présentant le document. Si l'auteur l'a autorisé, son adresse mail apparaîtra lorsque vous cliquerez sur le bouton « Détails » (à droite du nom).

Dans le cas contraire, vous pouvez consulter en ligne les annuaires de l'ordre des médecins, des pharmaciens et des sages-femmes.

Contact à la Bibliothèque universitaire de Médecine Pharmacie de Grenoble :

[bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr)

Année : 2020

**RADIOMARQUAGE, CARACTERISATION ET BIODISTRIBUTION DE LA  
COMPLEXATION DU 99MTC PAR DEUX CHELATES DEJA SYNTHETISES  
COMME SIDEROPHORES : O-TRENOX TRIS (8-HYDROXY-QUINOLEINE) ET O-  
TRENOSX TRIS (8-HYDROXY-5-SULFONATE-QUINOLEINE)**

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE  
PHARMACIE HOSPITALIERE - PRATIQUE ET RECHERCHE

Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THÈSE  
PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE  
DIPLÔME D'ÉTAT

Alexandre BIGUET PETIT JEAN

[Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE  
GRENOBLE

Le : 28/10/2020

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

M. Michel SEVE, Pharmacien - Professeur des Universités

Membres :

M. Julien LEENHARDT, Pharmacien – Assistant Hospitalier Universitaire (directeur de thèse)

Mme Marie-Dominique DESRUET, Pharmacien – Praticien Hospitalier

M. Philippe GARRIGUE, Pharmacien - Maître de Conférences Universitaire - Praticien Hospitalier

M. Amaury DU MOULINET D'HARDEMARE, Docteur en Chimie - Maître de Conférences  
Universitaire

M. Alexis BROISAT, Docteur en Ingénierie Biomédicale, HDR

*L'UFR de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises  
dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

Année : 2020

**RADIOMARQUAGE, CARACTERISATION ET BIODISTRIBUTION DE LA  
COMPLEXATION DU 99MTC PAR DEUX CHELATES DEJA SYNTHETISES  
COMME SIDEROPHORES : O-TRENOX TRIS (8-HYDROXY-QUINOLEINE) ET O-  
TRENOSX TRIS (8-HYDROXY-5-SULFONATE-QUINOLEINE)**

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE  
PHARMACIE HOSPITALIERE - PRATIQUE ET RECHERCHE

Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THÈSE  
PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE  
DIPLÔME D'ÉTAT

Alexandre BIGUET PETIT JEAN

[Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE  
GRENOBLE

Le : 28/10/2020

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

M. Michel SEVE, Pharmacien - Professeur des Universités

Membres :

M. Julien LEENHARDT, Pharmacien – Assistant Hospitalier Universitaire (directeur de thèse)

Mme Marie-Dominique DESRUET, Pharmacien – Praticien Hospitalier

M. Philippe GARRIGUE, Pharmacien - Maître de Conférences Universitaire - Praticien Hospitalier

M. Amaury DU MOULINET D'HARDEMARE, Docteur en Chimie - Maître de Conférences  
Universitaire

M. Alexis BROISAT, Docteur en Ingénierie Biomédicale, HDR

*L'UFR de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises  
dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

Doyen de la Faculté : M. le Pr. Michel SEVE

Vice-doyen et Directrice des Etudes :  
Mme Christine DEMEILLIERS

Année 2020 - 2021

### ENSEIGNANTS – CHERCHEURS

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
MCF	ALDEBERT	DELPHINE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx
PU-PH	ALLENET	BENOIT	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheMAS
PU	BAKRI	ABDELAZIZ	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
MAST	BARDET	JEAN-DIDIER	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheMAS
MCF	BATANDIER	CECILE	LBFA – INSERM U1055
PU-PH	BEDOUC	PIERRICK	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheMAS
MCF	BELAIDI-CORSAT	ELISE	HP2, Inserm U1042
MAST	BELLET	BEATRICE	-
MCF	BOUCHERLE	BENJAMIN	DPM - UMR 5063 CNRS
PU	BOUMENDJEL	AHCENE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	BOURGOIN	SANDRINE	IAB – CRI INSERM U823
MCF	BRETON	JEAN	LCIB – UMR E3 CEA
MCF	BRIANCON-MARJOLLET	ANNE	HP2 – INSERM U1042
PU	BURMEISTER	WILHEM	UVHCI- UMI 3265 EMBL CNRS
MCU-PH	BUSSER	BENOIT	Institute for Advanced Biosciences, UGA / Inserm U 1209 / CNRS 5309
Professeur Émérite	CALOP	JEAN	
MCF	CAVAILLES	PIERRE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
MCU-PH	CHANOINE	SEBASTIEN	CR UGA - INSERM U1209 - CNRS 5309
MCF	CHOISNARD	LUC	DPM – UMR 5063 CNRS
MCU-PH	CHOVELON	BENOIT	DPM – UMR 5063 CNRS
PU-PH	CORNET	MURIEL	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx
Professeur Émérite	DANEL	VINCENT	-
PU	DECOUT	JEAN-LUC	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF Émérite	DELETRAZ-DELPORTE	MARTINE	LPSS – EAM 4129 LYON
MCF	DEMEILLERS	CHRISTINE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
PU-PH	DROUET	CHRISTIAN	GREPI EA7408
PU	DROUET	EMMANUEL	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale
MCF	DURMORT	CLAIRE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
PU-PH	FAURE	PATRICE	HP2 – INSERM U1042

Mise à jour le 14/09/2020

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
MCF	FAURE-JOYEUX	MARIE	HP2 – INSERM U1042
PRCE	FITE	ANDREE	-
MCU-PH	GARNAUD	CECILE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX
PRAG	GAUCHARD	PIERRE-ALEXIS	-
MCU-PH	GERMI	RAPHAELE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale
MCF	GEZE	ANNABELLE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF Émérite	GILLY	CATHERINE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	GODIN-RIBUOT	DIANE	HP2 – INSERM U1042
Professeure Émérite	GRILLOT	RENEE	-
MCF Émérite	GROSSET	CATHERINE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	GUIEU	VALERIE	DPM – UMR 5063 CNRS
AHU	HENNEBIQUE	AURELIE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX
MCF	HININGER-FAVIER	ISABELLE	LBFA – INSERM U1055
MCF	KHALEF	NAWEL	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
MCF	KOTZKI	SYLVAIN	HP2 – UMR S1042
MCF	KRIVOBOK	SERGE	DPM – UMR 5063 CNRS
AHU	LEENHARDT	JULIEN	INSERM – U1039
PU	LENORMAND	JEAN-LUC	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX
PU	MARTIN	DONALD	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
PRCE	MATTHYS	LAURENCE	-
CDD	MAZET	ROSELINE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	MELO DI LIMA	CHRISTELLE	LECA – UMR CNRS 5553
AHU	MINOVES	MELANIE	HP2 – INSERM U1042
PU	MOINARD	CHRISTOPHE	LBFA - INSERM U1055
PU-PH	MOSSUZ	PASCAL	LAB – INSERM U1209
MCF	MOUHAMADOU	BELLO	LECA – UMR 5553 CNRS
MCF	NICOLLE	EDWIGE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	OUKACINE	FARID	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	PERES	BASILE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	PEUCHMAUR	MARINE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	PEYRIN	ERIC	DPM – UMR 5063 CNRS
AHU	PLUCHART	HELENE	TIMC-IMAG – UMR 5525 CNRS, TheMAS
PU	RACHIDI	WALID	LCIB – UMR E3 CEA
MCF	RAVELET	CORINNE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	RIBUOT	CHRISTOPHE	HP2 – INSERM U1042
PAST	RIEU	ISABELLE	-
Professeure Émérite	ROUSSEL	ANNE-MARIE	-

Mise à jour le 14/09/2020

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
PU-PH	SEVE	MICHEL	LBFA – INSERM U1055
MCF	SOUARD	FLORENCE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	SPANO	MONIQUE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
MCF	TARBOURIECH	NICOLAS	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
MCF	VANHAVERBEKE	CECILE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	WARTHER	DAVID	DPM – UMR 5063 CNRS
PU Emerite	WOUESSIDJEWÉ	DENIS	DPM – UMR 5063 CNRS

AHU : Assistant Hospitalo-Universitaire  
 ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches  
 BCI : Biologie du Cancer et de l'Infection  
 CHU : Centre Hospitalier Universitaire  
 CIB : Centre d'Innovation en Biologie  
 CRI : Centre de Recherche INSERM  
 CNRS : Centre National de Recherche Scientifique  
 DCE : Doctorants Contractuels Enseignement  
 DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire  
 HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire  
 IAB : Institute for Advanced Biosciences  
 IBS : Institut de Biologie Structurale  
 LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes  
 LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée  
 LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux  
 LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie  
 LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine  
 LPSS : Laboratoire Parcours Santé Systémique  
 LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques  
 MAST : Maître de Conférences Associé à Temps Partiel  
 MCF : Maître de Conférences des Universités  
 MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers  
 PAST : Professeur Associé à Temps Partiel  
 PRAG : Professeur Agrégé  
 PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement  
 PU : Professeur des Universités  
 PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers  
 SyMMES : Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Energie et la Santé  
 TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation  
 UMR : Unité Mixte de Recherche  
 UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Mise à jour le 14/09/2020

# Remerciements

## **À mon directeur de thèse**

Monsieur Julien LEENHARDT,

Je te remercie de m'avoir proposé ce sujet qui est passionnant, j'ai pris beaucoup de plaisir à manipuler et à découvrir la recherche en radiopharmacie avec toi. Ces 13 mois en radiopharmacie à Grenoble furent un vrai plaisir, j'ai appris énormément de choses et travailler à tes côtés m'a donné envie de poursuivre dans cette voie.

## **Au président et membres du jury**

À Monsieur Michèle SEVE

Merci d'avoir accepté de juger ce travail et de le présider

À Madame Marie-Dominique DESRUET,

Merci pour m'avoir appris tant de chose pendant ces 13 mois de stage en radiopharmacie. C'est en partie grâce à votre accueil et votre disponibilité que j'ai souhaité faire le DESC de radiopharmacie. Merci pour tous vos conseils et pour votre sollicitude, notamment l'attention portée pour mon post-internat.

À Monsieur Amaury DU MOULINET D'HARDEMARE

Merci pour ces nombreux conseils sur la chimie et les indications à suivre afin de mener ce travail à bien. Tes schémas m'ont grandement aidé à la compréhension de ces expérimentations.

À Monsieur Alexis BROISAT

Merci pour ta disponibilité, ta gentillesse et ton aide apportée pour la réalisation de ce travail, notamment l'étude de la biodistribution et la reconstruction des images.

À Monsieur Philippe GARRIGUE

Merci d'avoir acceptée de faire partie de mon jury de thèse et de juger ce travail en apportant votre vision de la radiopharmacie marseillaise.



## **Mes pensées vont ensuite tout naturellement à ma famille,**

Bien entendu mes parents que je remercie de m'avoir soutenu et encouragé dans toutes les étapes de ma vie. Merci pour tout ce que vous avez pu m'apporter

Ma sœur Aure-Elise qui est source de réussite et de courage, avec Jules et Sébastien

Mon frère Adrien et nos magnifiques et inspirantes épopées splitboardesques dans les belles montagnes alpines

Mes grands-parents, que j'aime très fort : ma grand-mère qui je l'espère pourra venir à la soutenance, et mon grand-père à qui je pense beaucoup même si je n'ai pas pu beaucoup le voir ces derniers temps

Quentin, Aurélie, Charlotte et Corentin mon filleul la magnifique petite famille

Ma marraine Sylvie, Jean, Flore et Valentin

## **Mes amis du lycée et avant**

Nicolas, le joyeux trublion. Stephen et nos nombreuses sorties trail et celle à venir, Florian Quentin et notre jeunesse dans les arbres

## **Les amis de la faculté**

Pierre, il faudra quand même que l'on aille surfer un jour mais pas à Bali,  
Ce fut une sacrée expédition avec Rémi à Inter-rail, que des bons souvenirs.

Robin et cette magnifique année de corpo passée ensemble, sans oublier les soirées Fred & Jamy

PEG avec une très belle année de colloc à La Tronche quand nous préparions l'internat

Mathieu le Jarrois de cœur, merci de m'avoir hébergé pendant le DESC avec Juliette ☺  
Lara aussi et globalement à la team Parisienne, ça fait toujours plaisir de monter vous voir

Olivia et tous ces moments partagés qui se raréfient malheureusement

Aurélie il va falloir qu'on aille faire des sorties trail également maintenant que tu t'y es mise et que tu es revenue de la Réunion

Quentin, revenu de la Suisse pour renforcer l'équipe de Grenoble

Pensée aussi au reste de l'équipe de la corpo et cette très belle année passée ensemble

Marianne prête pour une sortie ski de rando  
Nassim, on ne se voit plus beaucoup mais les années de fac furent un régal

A remettre bientôt l'expédition rando Pierre<sup>2</sup>, sans mal au genou cette fois ci

Alex hâte que tu sois interne, pourquoi pas à St Etienne !

Pensée aussi pour tous mes co interne : Assia à St-Egreve, on était la fine équipe que des bons souvenirs. Pauline aux ATUs enfin pas trop, et toute l'équipe de la PUI Marion, Marie et Manon (MMM). Et aux autres avec qui je n'ai pas eu le plaisir de partager un semestre, Laure tu vas être bien à Annecy, Pauline, Marie

Tristan, Anaëlle et Quentin toujours autant de plaisir à vous retrouver

Merci à toute l'équipe de la radiopharmacie du CHUGA pour ces 13 mois passés avec vous, Emilie, Pauline, Laure

Merci également à toute l'équipe du LRB Clémence, Florian, Alexis, Mitra et les autres pour l'aide apportée lors de l'expérimentation animale pour ce travail.

Laetitia merci pour tout, ta présence, ton soutien, tes petites attentions au quotidien. Nous voici « presque » partis pour St Etienne pour la suite et les grandes aventures à venir. Je suis heureux que nous partageons tout cela ensemble.

# Avant-propos

“If we knew what it was we were doing, it would not be called research, would it?”

– inconnu

## Table des matières

Index des tableaux.....	12
Index des figures .....	13
Abréviations officielles .....	14
Introduction générale.....	16
1. La médecine nucléaire – médicaments radiopharmaceutiques .....	17
2. La Tomographie par Emission Mono Photonique (TEMP) - Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) .....	18
3. Théranostique .....	19
4. Chimie de coordination .....	20
4.1. Principes généraux .....	20
4.2. Notion d'isomérisation.....	21
5. Réaction redox.....	22
6. Les sidérophores.....	22
6.1. Généralités .....	22
6.2. Chimie des sidérophores .....	23
6.3. Synthèse du <i>O</i> -trenox et <i>O</i> -trensox.....	23
7. Le fer.....	24
8. Le technétium-99m .....	25
8.1. Propriétés physiques du technétium .....	25
8.2. Obtention du technétium.....	26
8.3. Chimie du technétium .....	27
8.4. Synthèse des complexes du technétium .....	28
8.5. Synthèse avec l'acide chlorhydrique (HCl) comme réducteur .....	29
9. Le Rhénium.....	30
10. Contrôles de la pureté radiochimique.....	31
10.1. Généralités .....	31
10.2. Chromatographie sur couche mince (ou TLC pour Thin Layer Chromatography).....	32
10.3. Chromatographie liquide haute performance (HPLC).....	34
Article scientifique.....	36
1. Introduction:.....	36
2. Experimental part / Materials and methods:.....	39
2.1. Radiolabeling of trenox by technetium-99m .....	39
2.2. Quality controls .....	40

2.2.1.	Thin layer chromatography .....	40
2.2.2.	High performance liquid chromatography .....	41
2.3.	Indirect radio-synthesis via $TcCl_6$ .....	41
2.4.	Reaction kinetics and <i>in vitro</i> radiochemical stability .....	42
2.5.	Partition coefficient determination.....	42
2.6.	Charger Determination.....	42
2.7.	In vitro stability of the complex in contact with human blood .....	43
2.8.	Animal experimentation: biodistribution and imaging .....	43
3.	Results and discussion:.....	44
3.1.	Optimal conditions for synthesis.....	44
3.1.1.	Type and quantity of reducer .....	44
3.1.2.	Amount of ligand .....	45
3.1.3.	Effect of pH.....	47
3.1.4.	Temperature.....	48
3.2.	Identification and radiochemical purity of the compound: ITLC and HPLC analysis.....	48
3.2.1.	$^{99m}Tc$ -Trenox .....	48
3.2.2.	$^{99m}Tc$ -Trensox.....	50
3.3.	Results with indirect synthesis via $^{99m}TcCl_6^{2-}$ .....	52
3.4.	Reaction kinetics and in vitro radiochemical stability.....	53
3.4.1.	$^{99m}Tc$ -trenox.....	53
3.4.2.	$^{99m}Tc$ -trensox .....	54
3.5.	Complex partition coefficient log P .....	55
3.6.	Complex's charge .....	55
3.7.	In vitro stability of the complex in contact with blood .....	56
3.7.1.	$^{99m}Tc$ -trenox.....	56
3.7.2.	$^{99m}Tc$ -trensox .....	57
3.8.	Animal experimentation: biodistribution and imaging .....	58
4.	Conclusion .....	63
	Discussion globale .....	65
	Conclusion générale .....	68
	Bibliographie.....	70
	Serment de Galien.....	74
	Résumé.....	75

## Index des tableaux

Tableau 1 : trois couples rédox d'intérêt et leurs potentiels standards .....	22
Tableau 2 : Comparaison des trois métaux de transition décrits dans cette étude .....	31
Table 3 : Variation of the radiochemical yield of <sup>99m</sup> Tc-trenox as a function of pyrophosphate amount .....	45
Table 4 : Effect of reaction medium's pH on the radiochemical yield of <sup>99m</sup> Tc-trenox in ITLC (mean+/- SD) (n=3) .....	48
Table 5 : Chromatographic analysis of each species on Whatman 0.16MM paper in a 4:1 Chloroform - Ethanol mixture .....	49
Table 6 : Chromatographic analysis on silica gel paper in two different developing phases .....	51
Table 7 : Effect of the reaction time on the radiochemical yield of <sup>99m</sup> Tc-trenox in ITLC (n=3) and HPLC (n=1) .....	54
Table 8 : Effect of the reaction time on the radiochemical yield of <sup>99m</sup> Tc-trenox in ITLC (n=3) .....	54
Table 9 : Complex migration on different thin layer chromatography (mean +/- SD) (n=3) .....	56
Table 10 : Binding to blood cells and plasma proteins and <i>in vitro</i> metabolism of <sup>99m</sup> Tc-trenox .....	57
Table 11 : Binding to blood cells and proteins and <i>in vitro</i> metabolism of <sup>99m</sup> Tc-trenox .....	57
Table 12 : A comparison of the results obtained with the two chelates when linked to <sup>99m</sup> Tc .....	63

## Index des figures

Figure 1: les différents constituants d'un médicament radiopharmaceutique .....	17
Figure 2 : Principe d'une caméra TEMP .....	19
Figure 3 : Isomérisie <i>cis-trans</i> dans les complexes du platine .....	21
Figure 4 : 8-hydroxyquinoléine.....	23
Figure 5 : Schéma de synthèse du O-TRENOX et O-TRENOSX.....	24
Figure 6 : Schéma de décroissance du Molybdène-99.....	26
Figure 7 : Schéma d'un générateur de ( $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ ).....	26
Figure 8 : $\text{N}_3\text{S}$ stabilise le cœur Tc-oxo au degré +V (schéma structural de $[\text{TcO}(\text{MAG}_3)]^-$ ) .....	28
Figure 9 : Exemple de chromatographie sur couche mine.....	32
Figure 10 : Principe du radiochromatographe. ....	33
Figure 11 : Exemple de résultat obtenu suite à une analyse iTLC lue par un radiochromatographe ...	33
Figure 12 : Schéma d'une chaine de montage HPLC.....	35
Figure 13 : Exemple de résultat obtenu suite à une analyse HPLC .....	35
Figure 14 : Trenox chemical structure.....	37
Figure 15 : Trensox chemical structure, chemical formula ( $\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{N}_7\text{Na}_3\text{O}_{15}\text{S}_3$ ) .....	38
Figure 16 : HPLC analysis characteristics for both chelates .....	41
Figure 17 : Variation of the radiochemical yield of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -trenox as a function of trenox amount (n=3) .....	46
Figure 18: Variation of the radiochemical yield of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -trensox as a function of trensox amount (n=1) .....	47
Figure 19 : $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -trenox chromatographic analysis on Whatman 0.16MM paper in a 4:1 Chloroform – Ethanol mixture .....	50
Figure 20 : Radiochromatogram HPLC of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -trenox (total counts in red and mAU in blue) .....	50
Figure 21 : Radiochromatogram HPLC of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -trensox (total counts in red and mAU in blue).....	52
Figure 22 : Radiochromatogram HPLC of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -trenox via $^{99\text{m}}\text{TcCl}_6^{2-}$ (total counts in red and mAU in blue).....	53
Figure 23 : Biodistribution of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -trenox (above) and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -trensox (below) in 12 mice each at 3 different times (30, 60 and 240 minutes) formulated in %ID/g mean and standard deviation .....	58
Figure 24 : Comparative biodistribution of both chelate at each times (4 mice per chelate per times) formulated in %ID/g mean and standard deviation.....	60
Figure 25 : Visualization of small pellet in n°2 mouse lung 240min after injection (left) and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - trenox pulmonary uptake function of time from radiolabelling (right) .....	61
Figure 26 : Nano SPECT/CT whole body mice_n°2, 30, 60 and 240 min after $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Trenox (left) and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Trensox (right) injection.....	62

## **Abréviations officielles**

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

HPLC : High Performance Liquid Chromatography)

iTLC : instant Thin-Layer Chromatography

KeV : Kilo Electron-Volt

MBq : MégaBecquerel

MeV : Méga Electron-Volt

MRP : Médicament Radio-Pharmaceutique

PBS : Phosphate-buffered saline

PRC : Pureté Radio-Chimique

RCP : Radio-Chemical Purity

TEMP : Tomographie par Emission Mono-Photonique

TEP : Tomographie par Emission de Positons





## Introduction générale

La tomographie par émission monophotonique (TEMP) est une technique d'imagerie non invasive utilisée en médecine nucléaire. De par ses propriétés physique et chimique ainsi que son faible coût, le technétium-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ) est le radionucléide le plus utilisé dans le monde pour la préparation de médicaments radiopharmaceutiques destinés à la scintigraphie diagnostic.

Les sidérophores sont des chélateurs du fer (porteurs du fer) synthétisés et sécrétés notamment par les micro-organismes, mais aussi par les mammifères. Afin de pouvoir réguler la quantité de fer circulant dans un organisme, de nombreux sidérophores ont été synthétisé chimiquement dans le but de chélater ce fer en excès responsable de toxicité, par exemple pour l'élaboration de nouveaux médicaments. Ces sidérophores synthétiques ont également la capacité de chélater d'autres métaux chargés. Certains de ces métaux chargés sont utilisés en physique nucléaire, tels que le Gallium<sup>68</sup> et le Technétium<sup>99</sup>.

L'intérêt est donc de trouver de nouvelles molécules pour chélater le  $^{99m}\text{Tc}$  et ainsi développer de nouveaux radio-traceurs utilisable en imagerie nucléaire.

Un bon chélate doit répondre aux considérations suivantes :

- La préparation doit être effectuée dans une solution compatible avec une injection chez l'homme, notamment en termes de stérilité
- La pureté radiochimique finale doit être supérieure à 95%
- Avoir une stabilité de marquage et une inertie vis-à-vis des molécules in vivo, c'est à dire une forte interaction entre le métal et le ligand pour éviter des phénomènes de dé-complexation (démétallation)
- La durée du marquage doit être inférieure à 60 minutes pour le  $^{99m}\text{Tc}$  (fonction de la demi-vie du radioisotope)
- Le complexe doit former un nombre minimum d'isomères car ils peuvent avoir des propriétés biologiques différentes

Deux sidérophores retiennent notre intérêt, *O*-trenox et *O*-trensox. Nous nous emploierons à mettre en évidence la possibilité de chélation par ces deux sidérophores du  $^{99m}\text{Tc}$ . Une fois que la chélation sera prouvée nous caractériserons les complexes ainsi formés pour en connaître les propriétés physico-chimiques et métaboliques. Ceci permettra de savoir si les complexes formés répondent aux cinq considérations listées ci-dessus.

Ces étapes sont préliminaires dans le développement d'un nouveau radio-traceur du  $^{99m}\text{Tc}$  utilisant le trenox et le trensox comme chélate.

## 1. La médecine nucléaire – médicaments radiopharmaceutiques

La médecine nucléaire est une spécialité médicale qui utilise des radionucléides (isotopes radioactifs) à des fins d'études, de diagnostic et de thérapie.

Ces radionucléides sont contenus dans des médicaments appelés médicament radiopharmaceutiques (MRP) (1). Ces médicaments peuvent être prêts à l'emploi ou sous forme de préparation pharmaceutique réalisée à partir de trousse, précurseurs et générateurs.

Un radionucléide ou radioisotope est une espèce atomique instable, qui tend à se désintégrer en émettant un rayonnement exploitable en médecine nucléaire (scintigraphie), pour rejoindre un état stable. Il est caractérisé par son nombre de masse, son numéro atomique, ainsi que par son état énergétique (2).

Les différents composants d'un médicament radiopharmaceutique sont montrés en Figure 1. Le vecteur est une molécule biologiquement active qui a une affinité pour une cible biologique et le chélateur permet d'emprisonner l'isotope radioactif dans une « cage » afin qu'il reste fixé dans le MRP. Le risque à éviter à tout prix étant la sortie de l'isotope du MRP (la décomplexation de l'ensemble chélate-isotope) conduisant à une dissémination de l'isotope dans le corps du patient et donc une irradiation délétère car non contrôlée.

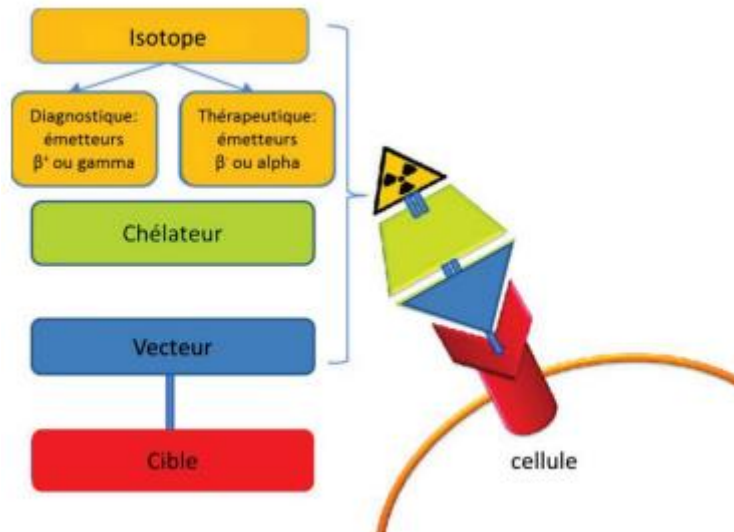


Figure 1: les différents constituants d'un médicament radiopharmaceutique (4)

Après administration en petite quantité (adaptée au poids et à l'âge du patient) par voie intraveineuse ou orale, la durée d'utilisation de ces médicaments est très courte en raison de la période physique du radionucléide, de quelques minutes à quelques jours au maximum.

L'administration au patient d'un radioélément émetteur  $\gamma$  ou  $\beta^+$  permet d'obtenir des informations sur le fonctionnement métabolique et fonctionnel d'un organe ou d'une partie d'un organe. L'étude

du devenir de cette molécule radioactive par détection externe permet de réunir des informations sur le patient en profondeur et de façon non invasive. La plupart des organes sont susceptibles de faire l'objet d'une exploration scintigraphique révélant leur morphologie et leur fonctionnalité.

Les médicaments utilisant un radioélément émetteur  $\beta^-$  de haute énergie sont eux utilisés en thérapeutique. Ils permettent l'irradiation sélective d'un organe ou d'une tumeur entraînant la mort cellulaire par blocage du cycle de division cellulaire.

## 2. La Tomographie par Emission Mono Photonique (TEMP) - Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT)

La TEMP utilise des produits radiopharmaceutiques marqués avec des émetteurs gamma d'énergies différentes (comme le  $^{99m}\text{Tc}$  ou le  $^{123}\text{I}$ ). La TEMP permet également l'imagerie tridimensionnelle et il existe aujourd'hui des scanners hybrides, couplés à la tomodensitométrie TEMP/TDM. Des exemples d'utilisation de radiopharmaceutiques pour la TEMP : la visualisation du tissu osseux avec des bisphosphonates radio-marqués au  $^{99m}\text{Tc}$  ou l'imagerie de perfusion myocardique utilisant le Sestamibi- $^{99m}\text{Tc}$ .

En raison d'une meilleure résolution et quantification de l'image la TEP (tomographie par émission de positons) est souvent préférée, si des traceurs approuvés présentant les mêmes caractéristiques que les traceurs TEMP respectifs sont disponibles. Cependant, les radionucléides TEMP sont plus largement disponibles et ont une demi-vie physique plus longue, de sorte que ces produits radiopharmaceutiques sont préférables pour certains examens cliniques.

Après injection au patient d'un médicament radiopharmaceutique émetteur  $\gamma$ , le patient est placé sous la gamma caméra. La caméra capte une partie seulement des rayons  $\gamma$  qui sont émis par le patient : les collimateurs permettent la sélection des photons gamma qui ont une incidence perpendiculaire au détecteur. Le détecteur est constitué d'un cristal d'iodure de sodium (NaI) avec des impuretés de thallium (Ti). Il transforme les photons gamma issus de la désintégration du  $^{99m}\text{Tc}$  (ou autre émetteurs gamma) en photons lumineux. Ces derniers sont ensuite convertis en courant électrique grâce aux photomultiplicateurs. L'image est ensuite reconstituée informatiquement et visible en trois dimensions.

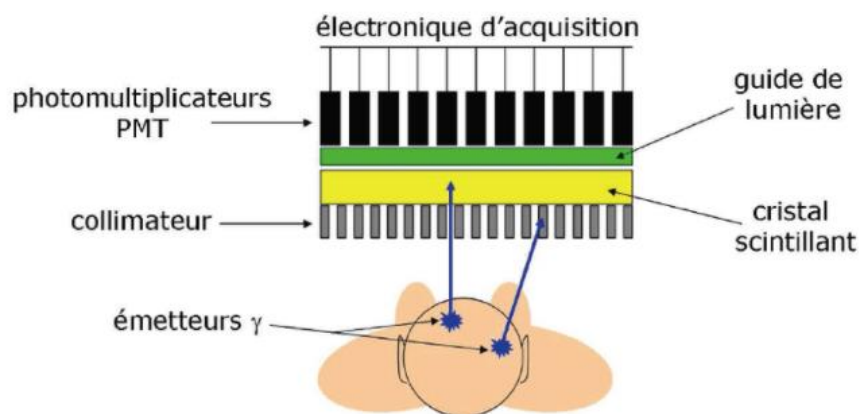


Figure 2 : Principe d'une caméra TEMP (Carlier et al 2007)

### 3. Théranostique

La théranostique, dérivé des termes *thérapie* et *diagnostic*, satisfait une nouvelle approche médicale visant à privilégier le développement concomitant des aspects diagnostique et thérapeutique en médecine nucléaire (3). L'objectif est de visualiser pour mieux traiter la pathologie en associant un test diagnostique et une thérapie ciblée.

L'activité tumorale est dans un premier temps étudiée de manière individualisée par une technique d'imagerie fonctionnelle, comme une image TEMP ou TEP. Le vecteur utilisé pourra être identique à celui qui sera utilisé dans la thérapie ciblée associée. Un traceur permettant l'imagerie (émetteurs de photons ou de positons) sera accroché au vecteur. Ceci permet une caractérisation fine de la maladie, notamment de ses cibles moléculaires. Du point de vue de la thérapie, l'accent est mis sur les thérapies ciblées (radiothérapie interne vectorisée avec des anticorps, des peptides ou d'autres petites molécules) qui sont maintenant disponibles grâce aux progrès de la biologie.

Les couples de radioisotopes utilisés classiquement en théranostique sont le Gallium-68 ( $\beta^+$ )/Lutetium-177 ( $\beta^-$ ) et le couple Technétium-99m ( $\gamma$ )/Rhenium-188 ( $\beta^-$ ).

Le vecteur est en général le même que ce soit pour le diagnostic ou pour la thérapeutique. Il faut alors trouver un chélate commun aux deux radioisotopes du couple pour l'utiliser à la fois pour le diagnostic et pour le traitement (4). L'unique changement entre le médicament diagnostique et le médicament thérapeutique sera donc l'isotope qui radio-marque l'ensemble chélate-vecteur.

Cette approche permet de nombreux progrès : sélection des patients mieux réceptifs au traitement, adaptation de la posologie pour chaque patient, meilleure sécurité pour le patient, meilleure

efficacité thérapeutique, suivi de la réponse du patient, réduction des coûts de santé publique par une élimination des traitements inutiles.

Avec la théranostique, la médecine nucléaire propose aux patients une radiothérapie ciblée et individualisée qui change la manière d'appréhender leur prise en charge de façon plus personnalisée par rapport à leur pathologie.

## 4. Chimie de coordination

### 4.1. Principes généraux

Les donneurs d'électrons réagissent sur les métaux ou leurs ions pour donner des complexes. Ces donneurs d'électrons sont nommés **ligands**. La stabilité du complexe formé entre un métal et son ou ses ligands dépend :

- Du nombre d'atome donneur (denticité) du ligand :

Un ligand peut donc avoir un atome donneur (ligand monodenté) ou plusieurs atomes donneurs : deux (bidenté) à six (hexadenté). Un ligand polydenté, donc avec au moins deux atomes donneurs, peut former avec le métal une structure coordonnée formant un ou plusieurs cycles. Ce ligand est alors nommé **chélate**. Les complexes formés les plus stables sont ceux impliquant un cycle à 5 atomes dont le métal.

- De la nature de cet atome donneur (dur ou mou).
  - Dans le cas où l'atome donneur est de forte électronégativité (qui attire fortement les électrons lors de sa liaison chimique avec un autre élément) et de faible polarisabilité il est dit dur et donc difficilement oxydable. La liaison avec un métal de transition sera alors plus aisée avec un état d'oxydation élevé de ce métal.
  - A contrario si l'atome donneur est de faible électronégativité et de forte polarisabilité, il est dit mou et facilement oxydable : il ne retient que faiblement ses électrons. La liaison sera alors facile avec un état d'oxydation faible du métal de transition.

Les ligands à atome donneur oxygène sont des bases dures de même que les ligands azotés ou chlorés. Ce sont donc ces atomes donneurs qui nous intéressent.

Les ions métalliques en  $d^0$  et les cations des éléments de transition dans leur haut degré d'oxydation sont des acides durs. Les acides durs se complexent de préférence avec les bases dures afin de former des complexes stables. Les complexes dur-mou seront eux instables (5).

La formation de complexes stables étant le but recherché, il conviendra donc d'utiliser un ion métallique de haut degré d'oxydation comme acide dur, et une base dure avec les donneurs d'électrons suivant : oxygène, azote ou chlore.

En cas de dé-complexation d'un complexe formé, l'ion métallique et le chélate se désolidarisent et forment à nouveau deux espèces distinctes dont le devenir n'est pas connu.

Le nombre de coordination correspond au nombre d'atomes donneurs qui sont liés directement au centre métallique. La coordinence 6 est la plus répandue, notamment concernant les complexes incluant un métal de transition (géométrie octaédrique). La coordinence 4 est également répandue avec des structures tétraédriques et plan carré.

#### 4.2. Notion d'isomérisation

On parle d'isomérisation de liaison si les formules globales sont identiques, mais que les différentes espèces sont arrangées différemment avec comme conséquence des différences dans les liaisons entre les atomes (liaisons interatomiques). Il existe notamment des isomérisations de coordination, de liaison du ligand (ligands ambidentates), de géométrie etc. (6).

On parle de stéréoisomérisation si deux ou plusieurs composés ont la même formule brute et la même géométrie mais les liaisons interatomiques diffèrent par leur arrangement spatial.

- S'ils sont symétriques par rapport à un plan on parle d'énantiomères.
- Sinon on parle de diastéréoisomères : cela comprend les isomérisations *cis-trans*. Les diastéréoisomères ont habituellement des propriétés chimiques et physiques différentes.

Les complexes de coordinence 4 peuvent donner des phénomènes d'isomérisation de liaison (*cis-trans*) comme pour les complexes du platine ci-dessous dans la Figure 3.

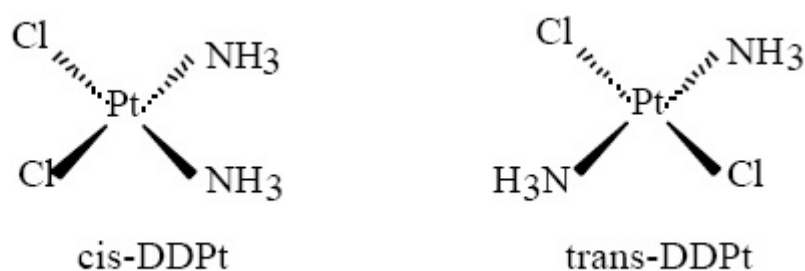


Figure 3 : Isomérisation *cis-trans* dans les complexes du platine ([https://www.aclg.be/Create/isomerie\\_CG/page\\_05.htm](https://www.aclg.be/Create/isomerie_CG/page_05.htm))

Les complexes de coordinence 6 peuvent former à la fois des isomères de liaison et des stéréoisomères (6). Il en résulte donc un nombre potentiellement élevé de ces isomères dont certains peuvent avoir des propriétés chimiques et physiques différentes. Ceci peut devenir un handicap pour un futur candidat chélate.

## 5. Réaction redox

Une réaction d'oxydation réduction ou réaction redox est une réaction chimique au cours de laquelle il y a un transfert d'électron du réducteur (donneur d'électron) à l'oxydant (accepteur d'électrons). La capacité de la forme oxydée à capter un ou des électrons ainsi que celle de la forme réduite à la céder peut être mesurée par le potentiel du couple redox. Ce potentiel standard en milieu aqueux est exprimé en Volt.

Couple redox	Equation redox	Potentiel standard en V
$\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$	$\text{Fe}^{3+} + \text{e}^{-} \leftrightarrow \text{Fe}^{2+}$	0.77
$\text{TcO}_4^{-}/\text{TcO}_2$	$\text{TcO}_4^{-} + 4\text{H}^{+} + 3\text{e}^{-} \leftrightarrow \text{TcO}_2(\text{s}) + 2\text{H}_2\text{O}$	0.74
$\text{ReO}_4^{-}/\text{ReO}_2$	$\text{ReO}_4^{-} + 4\text{H}^{+} + 3\text{e}^{-} \leftrightarrow \text{ReO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	0.51

Tableau 1 : trois couples redox d'intérêt et leurs potentiels standards

## 6. Les sidérophores

### 6.1. Généralités

Les sidérophores sont des molécules riches en atomes d'oxygène ou d'azote capables d'interagir avec un ion métallique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) et de le lier. Les sidérophores sont synthétisés et excrétés par le vivant, notamment les micro-organismes qui solubilisent le fer pour le transporter à l'intérieur de la cellule via des transporteurs membranaires (7,8). Afin de pouvoir réguler la quantité de fer circulant dans un organisme (par exemple chez l'homme), de nombreux sidérophores ont été synthétisés dans un but thérapeutique : celui de chélater ce fer en excès, responsable de toxicité.



## 6.2. Chimie des sidérophores

Les ions fer(III) sont hexacoordonnés et les hétéroatomes du sidérophore impliqués dans la sphère de coordination sont chacun positionnés aux angles d'un octaèdre. Les hétéroatomes sont en général appariés pour former des fonctions bidentates comme les catécholates, les hydroxamates et les hydroxyacides carboxyliques. Il faut par conséquent trois fonctions bidentates pour satisfaire aux règles de coordination de l'ion Fe(III) (9).

Des sidérophores possédant ces trois groupes bidentates peuvent lier l'ion ferrique avec une stœchiométrie 1 : 1. C'est-à-dire qu'un sidérophore possédant un tri bidentate complexe à lui seul un atome de fer.

Le fragment 8-hydroxyquinoléine bidenté offre une alternative aux groupes de coordination habituels rencontrés dans les sidérophores naturels (10). Ce chélate possède deux atomes donneurs : 1 oxygène et 1 azote. La 8-hydroxyquinoline est donc un chélateur bidentate.

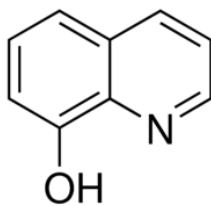


Figure 4 : 8-hydroxyquinoléine

Les sidérophores possédant trois motifs de la Figure 4 sont donc des chélates possédant trois fonctions bidentate (tris-hydroxyquinoline-based ligand).

Ces ligands montrent une grande capacité à complexer le fer (III), et sont notamment les deux chélates de l'étude : le *O*-trenox et le *O*-trensox. D'autres résultats confirment que la structure tripodale est bien adaptée à une forte coordination hexadentate (11).

Comme la 8-hydroxyquinoléine est un ligand bidenté non symétrique, il peut exister des isomères du complexe formé (10,11).

## 6.3. Synthèse du *O*-trenox et *O*-trensox

La préparation des 2 chélates a été réalisée par le Département de Chimie Moléculaire selon le schéma réactionnel ci-dessous : l'acide 8-hydroxyquinoline-7-carboxylique (composé 2) est couplé avec la Tris-(2-aminoéthyl) amine (TREN) pour former le composé 3 appelé *O*-TRENNOX. Une étape

supplémentaire permet l'introduction de groupes sulfonates en position 5 de chaque 8-hydroxyquinoline permettant de former le O-TRENSEX hydrosoluble.

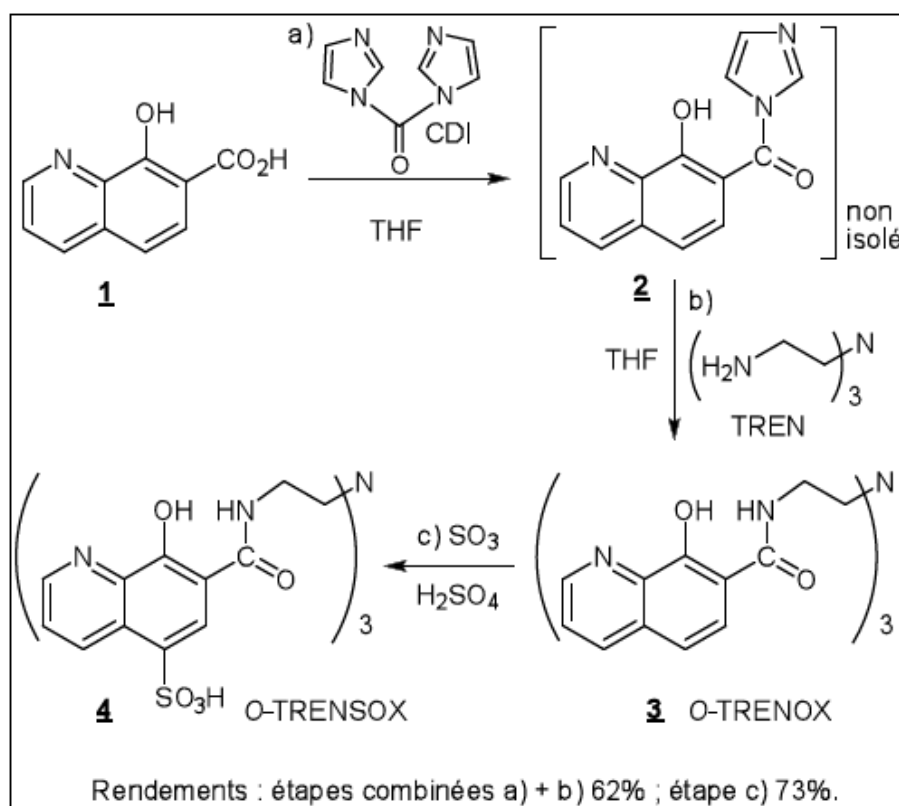


Figure 5 : Schéma de synthèse du O-TRENEX et O-TRENSEX (Leenhardt J mémoire M2)

A partir de ces informations sur les sidérophores, le postulat est que la chélation de l'ion technétium pourrait se faire de la même manière qu'avec l'ion fer concernant des chélateurs tri bidentate. La coordination pourrait donc être de type hexagonale et avec une formation d'au moins deux stéréoisomères.

## 7. Le fer

Le fer est un élément chimique de numéro atomique 26 appartenant à la famille des métaux de transition. Il se positionne dans la classification périodique entre le manganèse et le cobalt. Ce métal ubiquitaire est constitutif de nombreuses biomolécules et intervient ainsi dans des processus vitaux essentiels à la grande majorité des êtres vivants.

Ce métal est capable d'exister sous plusieurs degrés d'oxydation notamment +II ; +III avec la capacité de catalyser efficacement une grande variété de réactions d'oxydoréduction.

Le fer possède la faculté d'acquérir et de perdre facilement des électrons passant ainsi de la forme ferreuse  $\text{Fe}^{2+}$  à la forme ferrique  $\text{Fe}^{3+}$ , et inversement. Cette fonction unique lui permet de jouer un rôle dans le processus d'oxydation et de réduction du vivant, indispensable à la vie mais il est également toxique car il catalyse la production des espèces réactives de l'oxygène, entraînant un stress oxydatif. Nous verrons après ses caractéristiques communes avec le technétium.

## 8. Le technétium-99m

### 8.1. Propriétés physiques du technétium

Le technétium est un métal de transition artificiel de la deuxième série, de numéro atomique  $Z = 43$ . Il possède plus de 30 radioisotopes connus dont le technétium-99m.

Pour développer un médicament radiopharmaceutique à visée diagnostique, la première étape est d'incorporer des radionucléides facilement disponibles, avec des caractéristiques nucléaires favorables à des molécules de traceur. Le technétium-99m coche toutes les cases :

- C'est un émetteur  $\gamma$  pur de 140 keV, son énergie est donc optimale pour l'imagerie avec les gamma caméras actuelles (Energie compatible entre 100 et 200 keV).
- Ce rayonnement est pénétrant mais peu ionisant.
- La demi-vie de 6.02 h est suffisamment longue pour la préparation du radiopharmaceutique et son accumulation iv-vivo dans le tissu cible. Cela permet l'administration aux patients d'activités suffisamment importantes pour avoir de bonnes images scintigraphiques. Elle est en même temps assez courte pour réduire au minimum l'irradiation excessive du patient.
- De plus, il n'y a pas de rayonnement bêta ce qui permet l'administration d'activité élevée  $> 1000 \text{ MBq}$ .
- Il est facilement obtenu à partir d'un générateur de molybdène permettant sa production quotidienne directement dans les services de médecine nucléaire.
- Son coût est raisonnable.

Le  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  est le produit de la désintégration du  $^{99}\text{Mo}$  radioactif.

Ces éléments font du technétium-99m le radionucléide le plus utilisé pour la médecine nucléaire diagnostique.

## 8.2. Obtention du technétium

Le  $^{99m}\text{Tc}$  est obtenu par élution d'un générateur de Molybdène ( $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ ). Le molybdène est obtenu par fission de l'Uranium-235 ou par activation neutronique du  $^{98}\text{Mo}$  en réacteur nucléaire (12).

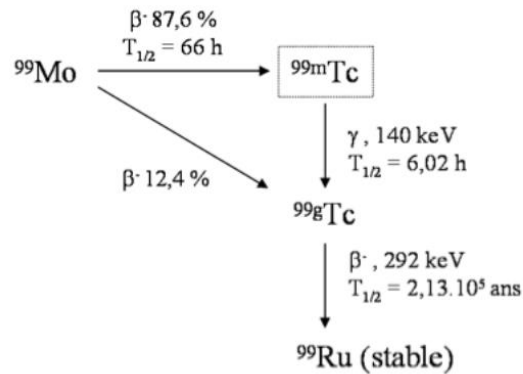
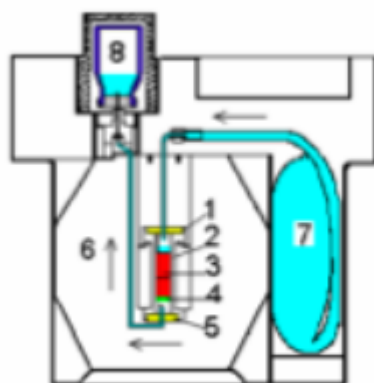


Figure 6 : Schéma de décroissance du Molybdène-99 (14)

Le fonctionnement du générateur est très simple : le molybdène est fixé sur une colonne d'alumine. Il se produit au cours du temps une désintégration progressive du  $^{99}\text{Mo}$  en  $^{99m}\text{Tc}$  sous forme de pertechnétate ( $\text{TcO}_4^-$ ) qui n'a pas d'affinité avec la colonne d'alumine. Le passage d'un éluant au contact de la colonne d'alumine permet de récupérer les ions pertechnétate alors que le molybdène reste fixé sur la colonne. L'éluant utilisé est une solution stérile aqueuse de chlorure de sodium 0.9 %. L'éluât est sous forme de  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4^-$ . L'ensemble du générateur est protégé par un conditionnement plombé afin de garantir la radioprotection des utilisateurs.



1. Capsule métallique
2. Colonne de verre
3. Alumine
4. Filtre
5. Capsule métallique
6. Blindage de plomb
7. Poche NaCl 0,9%
8. Flacon d'élution

Figure 7 : Schéma d'un générateur de ( $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ ) (applications biomédicales des rayonnements, Dr. Meghelli, biophysique-médicale)

### 8.3. Chimie du technétium

Sa configuration électronique est la suivante : [Kr] 4d<sup>5</sup> 5s<sup>2</sup> Il possède sept électrons « s » et « d » sur sa couche de valence. Ses degrés d'oxydation possibles sont au nombre de 9 : de -I à +VII, cependant en milieu aqueux seuls les degrés d'oxydation +III, +IV et +VII sont documentés. Les autres degrés d'oxydation sont stabilisés par la présence de ligands autre que l'eau (13–15).

Le technétium est disponible sous forme d'ion pertechnétate TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> (degré d'oxydation +VII) et c'est à partir de cet ion, que l'on obtiendra les médicaments radiopharmaceutiques technétiés. Le pertechnétate obtenu par le générateur ne donne pas directement de complexe, il doit être réduit à des degrés d'oxydation inférieure à VII pour pouvoir interagir et ainsi se complexer.

Un complexe de technétium est formé de l'ion central métallique technétium avec un ou plusieurs ligands. Les ligands sont des molécules possédant au moins un atome ayant un doublet d'électrons non liés (O, N, S, Cl) qui se lient directement au technétium central, dans la sphère de coordination du métal. Le technétium au degré d'oxydation +VII est d<sup>0</sup>, au degré d'oxydation +V il est d<sup>2</sup> donc c'est un acide dur qui doit donc se complexer avec une base dure, donc comprenant des atomes donneurs vu ci-dessus.

Le complexe peut être chargé négativement, neutre ou positivement, la charge dépend des pKa, mais aussi du pH de la solution et de la charge du cœur. Plusieurs géométries de coordination sont possibles avec un nombre de coordination pouvant varier de 1 à 12 en théorie, mais plus souvent de 2 à 6. Le nombre de coordination est le nombre d'atomes directement liés à l'atome de technétium central. Chaque ligand peut former jusqu'à 6 liaisons avec le technétium, il est alors dit hexadenté (tétradenté s'il forme 4 liaisons etc.)

Les degrés d'oxydation les plus stables et les plus facilement accessibles sont +I ; +III ; +IV et +V.

L'état d'oxydation V est l'un des plus importants de la chimie de coordination du technétium. Il est représenté par le monoxotechnétium TcO<sup>3+</sup> comprenant un atome d'oxygène et trois charges positives. Il se forme facilement au cours de la réduction du pertechnétate en milieu acide, le métal étant stabilisé par 4 atomes donneurs. Il est alors considéré comme pentacoordonné comme dans la figure 3 ci-dessous avec 3 atomes d'azote, 1 atome d'oxygène et 1 atome de soufre.

Mais lorsque les atomes donneurs sont des oxygènes ou des azotes, la position trans du groupe TcO<sup>3+</sup> peut être occupée par un autre ligand, donnant naissance à des structures hexa ou même heptacoordonnées.

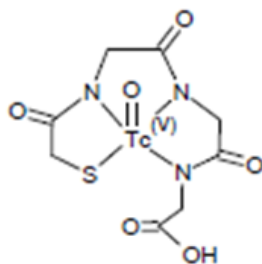


Figure 8 : N<sub>3</sub>S stabilise le cœur Tc-oxo au degré +V (schéma structural de [TcO(MAG<sub>3</sub>)]<sup>+</sup>)

Il existe aussi d'autres cœurs représentatifs de cet état d'oxydation : le dioxotechnétium TcO<sub>2</sub><sup>+</sup> qui se forme essentiellement en milieu basique avec un deuxième atome d'oxygène qui lie le technétium et le nitrurotechnétium TcN<sup>2+</sup> avec une triple liaison azote-technétium.

Le degré d'oxydation +IV est retrouvé par exemple chez les hexahalogénotechnétates utilisés comme substrats pour une réaction d'échange de ligand, comme le TcCl<sub>6</sub><sup>2-</sup>. La géométrie est alors souvent octaédrique et le complexe hexacoordonné.

L'état d'oxydation +III du technétium est obtenu avec ligands qui stabilisent à la fois les hauts et les bas degrés d'oxydation, qui donnent des composés hexacoordonnés octaédriques ou même des composés heptacoordonnés.

L'état d'oxydation +I avec par exemple le complexe hydrosoluble [<sup>99m</sup>Tc(MIBI)<sub>6</sub>]<sup>+</sup> utilisé comme agent de perfusion myocardique ou encore le cœur tricarbonyl [Tc(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> où le technétium est dans l'état d'oxydation +I (16).

#### 8.4. Synthèse des complexes du technétium

Trois composants sont impliqués dans la synthèse des complexes avec le technétium : le pertechnétate (TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>), le ligand (L) et le réducteur (R).

Le réducteur le plus communément utilisé est l'étain stanneux Sn<sup>2+</sup>. Disponible sous forme de chlorure d'étain (SnCl<sub>2</sub>), sa solubilité est suffisante à pH neutre si la complexation est immédiate et directe. SnCl<sub>2</sub> est plus soluble à pH acide, néanmoins à ce pH les ligands sont souvent protonés et peu ou pas disponible pour la complexation (protonation des azotes et acides carboxyliques ou phénols). On préférera utiliser une autre molécule stabilisatrice que les ions chlorures tel que des ions pyrophosphate ou tartrate (L'). Ces ligands faibles ou ligand de transfert, notés (L') stabilisent

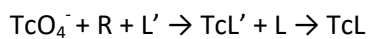
rapidement le technétium en formant des complexes intermédiaires [<sup>99m</sup>Tc-pyrophosphate] qui s'échangent par la suite totalement avec le ligand.

La réduction doit immédiatement être suivie de la complexation par un ligand. S'il n'y en a pas, le technétium réduit se transforme en une forme thermodynamiquement stable et non réactive, le TcO<sub>2</sub> technétium réduit et hydrolysé. C'est une impasse car cette forme ne peut plus par la suite se complexer.

La complexation peut être directe



Ou indirecte



Le complexe TcL est plus ou moins stable en fonction du ligand : il existe une probabilité de décomplexation. Le <sup>99m</sup>Tc libéré peut soit être réduit s'il est mis en présence de réducteur, soit oxydé en pertechnétate en présence d'oxygène soit capté par un autre ligand s'il en reste ou si on lui en apporte de nouveaux (in vivo ou au contact du sang). Un marquage qui se déstabilise sera marqué par une réapparition de technétium libre sous forme d'ion pertechnétate ou de technétium réduit hydrolysé.

Ce sont ces deux impuretés qui sont recherchées afin de connaître la pureté radiochimique d'un complexe.

### 8.5. Synthèse avec l'acide chlorhydrique (HCl) comme réducteur

Cette fois ci le technétium sous forme de TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> (degré d'oxydation +VII) est réduit au degré d'oxydation IV en utilisant de l'acide chlorhydrique. L'espèce principalement formée est le TcCl<sub>6</sub><sup>2-</sup>, un hexahalogénotechnétate qui est utilisé comme substrat pour des réactions d'échange de ligands. Cet intermédiaire de synthèse serait intéressant pour la préparation d'un nouveau radiopharmaceutique lipophile. On pourrait avoir une formulation de type TcL<sub>2</sub>X<sub>2</sub> ou TcL<sub>3</sub><sup>+</sup> avec L représentant un ligand bidentate (17).

Bien que peu décrite et très peu utilisée dans la pratique clinique de routine, cette utilisation du HCl comme agent réducteur présente néanmoins de nombreuses qualités. Après neutralisation de l'excès

de HCl, la seule autre espèce chimique présente dans la solution réduite de technétium est le NaCl, qui est contenu dans l'éluât obtenu du générateur ( $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ). Il n'y a donc pas d'ions stanneux dans le milieu, ni son ligand, qu'il s'agisse d'ions chlorure, pyrophosphate ou tartrate, selon le ligand stabilisateur de l'étain utilisé. On sait que ce ligand stabilisant interagit avec le technétium en créant des complexes de faible affinité. Dans la méthode d'évaporation sous vide d'acide chlorhydrique concentré, aucun cation métallique réducteur n'est appliqué (18). Leurs absences dans cette méthode rendent possible la séparation par simple précipitation et évite les interférences des radiocolloïdes  $^{99\text{m}}\text{Tc-Sn}$  dans les contrôles de qualité.

Cette méthode permet donc de "simplifier" les différentes réactions chimiques qui se produisent dans le milieu réactionnel. De plus, dans les conditions appropriées, il semblerait qu'une seule espèce de technétium réduit soit créée en utilisant de l'acide chlorhydrique concentré, donc un seul état d'oxydation (19). Le processus de synthèse est plus complexe, mais ne nécessite pas l'ajout d'oxygène (il ne reste pas d'eau).

## 9. Le Rhénium

Le rhénium possède deux radioisotopes artificiels émetteurs  $\beta^-$  présentant des caractéristiques nucléaires qui sont intéressantes pour des applications en thérapeutique. Le rhénium-188 est produit par un générateur  $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ , sa période est de 17 h, possède une énergie  $E_\beta$  à 2.1 MeV. Il est exempt d'isotope froid contrairement au rhénium 186 qui contient une proportion importante d'isotope non radioactifs. La période du  $^{186}\text{Re}$  est également plus longue (90h) et son énergie moins élevée  $E_\beta$  à 1.1 MeV. Il est également émetteur  $\gamma$  ce qui peut permettre de suivre facilement sa biodistribution.

La particule émise (électron) a un faible parcours dans la matière et permet de délivrer son énergie au contact d'une tumeur avec une énergie importante, permettant une mort cellulaire ciblée.

La chimie du rhénium présente un grand nombre d'analogie avec celle du technétium : ce sont des représentants du même groupe du tableau périodique, les degrés d'oxydation possibles sont les mêmes, leurs rayons ioniques sont très proches et leurs rayons atomiques mesurés sont même égaux (1.35 Å).



	Fer	Technétium	Rhénium
Numéro atomique	26	43	75
Groupe	8	7	7
Masse molaire (g.mol)	55.8	98	186.2
Rayon ionique (Å)	0.78 (Fe <sup>2+</sup> )	0.56 (TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup> )	0.53 (ReO <sub>4</sub> <sup>-</sup> )
Configuration électronique	[Ar] 3d <sup>6</sup> 4s <sup>2</sup>	[Kr] 4d <sup>5</sup> 5s <sup>2</sup>	[Xe] 4f <sup>14</sup> 5d <sup>5</sup> 6s <sup>2</sup>
Degré d'oxydation en solution	+II et +III	-I à +VII (d <sup>0</sup> )	-I à +VII (d <sup>0</sup> )
Nombre de coordination	6	2 à 7	4 à 7

Tableau 2 : Comparaison des trois métaux de transition décrits dans cette étude

Pendant il existe des différences de réactivité lorsque des réactions redox sont impliquées : l'ion TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> est un oxydant plus fort que son analogue rhénié ReO<sub>4</sub><sup>-</sup>.

Le degré d'oxydation +VII est représenté par la grande stabilité de l'anion ReO<sub>4</sub><sup>-</sup> qui résulte de l'hydrolyse des autres espèces en milieu oxydant. Les complexes les plus stables sont au degré d'oxydation +V, et sont généralement hexacoordonnés en formant une géométrie octaédrique, très semblable à ce qui est retrouvé pour le technétium (20).

Le trenox et le trenox pourraient donc complexer le rhénium sur un modèle proche de celui du technétium.

## 10. Contrôles de la pureté radiochimique

### 10.1. Généralités

Sur le plan macroscopique, aucun changement n'est observé dans le flacon de réaction suite à l'ajout des différents composants (Réducteur, ligand et pertechnétate) de la radiosynthèse et il n'y a aucun moyen de savoir si quelque chose s'est produit ou non. C'est au niveau chimique et moléculaire que les molécules se lient plus ou moins, et les contrôles de qualité permettent de quantifier ce niveau de changement.

La pureté radiochimique (PRC) est le rapport de la radioactivité du produit radiopharmaceutique qui est présente sous la forme de l'espèce radiochimique souhaitée sur la radioactivité totale de ce même isotope présent dans l'échantillon. En effet certains radionucléides peuvent s'oxyder ou s'hydrolyser par exemple lors de modification de pH, ce qui modifie leur réactivité et ainsi altère la spécificité des réactions chimiques propres au radionucléide (21).

La mesure de la PRC nécessite une méthode pour séparer et détecter avec précision toutes les différentes espèces radiochimiques qui peuvent être présentes dans la préparation radiopharmaceutique. On utilise pour cela des méthodes chromatographiques.

Deux analyses sont utilisées afin de savoir s'il y a eu une complexation entre le chélate et le technétium et la quantifier : chromatographie sur couche mince et chromatographie liquide haute pression ou haute performance (22,23).

## 10.2. Chromatographie sur couche mince (ou TLC pour Thin Layer Chromatography)

Elle est composée d'une phase stationnaire : fine couche d'un adsorbant (gel de silice, gel de silice en phase inversée, alumine...) enrobé dans un support. La phase mobile est un solvant/mélange de solvants dans lequel trempe la phase stationnaire. Il faut utiliser la bonne combinaison solvant/phase stationnaire afin d'identifier les espèces chimiques souhaitées : technétium libre, technétium réduit-hydrolysé et le ligand radiomarqué qui est le produit d'intérêt dont on veut connaître la PRC (24).

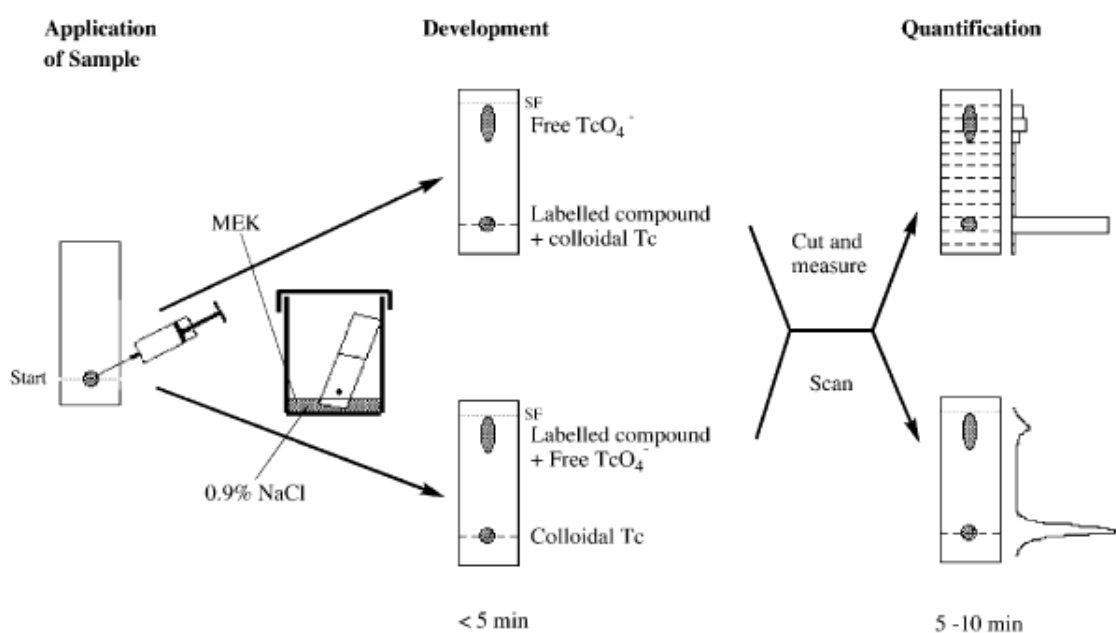


Figure 9 : Exemple de chromatographie sur couche mince (24)

Les composés sont séparés en fonction de leurs interactions avec la phase stationnaire et la phase mobile. Cela permet de calculer le facteur de rétention  $R_f$  qui est égal à la distance parcourue par le composé chimique divisé par la distance parcourue par le solvant. Pour un solvant et une phase stationnaire donnés, chaque composé aura un facteur de rétention caractéristique. Ce  $R_f$  est utilisé

pour détecter, identifier et quantifier une espèce chimique dans un mélange. Dans le cas d'une espèce radioactive, un détecteur de radioactivité placé au-dessus de la bandelette après la migration complète du solvant permet de compter la radioactivité en tout point, et de savoir d'où sont émis les rayonnements.

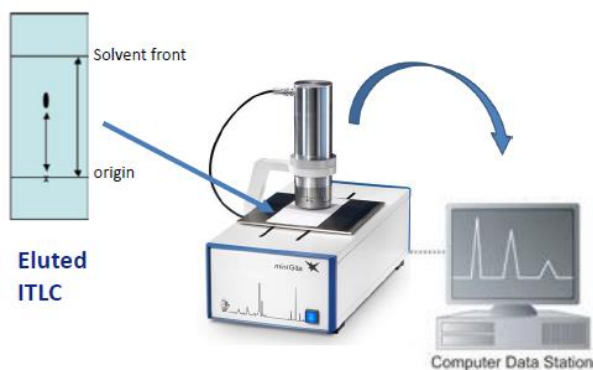


Figure 10 : Principe du radiochromatographe (Célia Fernandes Analytical control and purification of Radiopharmaceuticals)

Ci-dessous en figure 11 un chromatogramme obtenu après lecture par la sonde gamma. On voit qu'une partie de l'activité qui initialement était déposée au point 2 cm s'est déplacée vers le front de migration, c'est-à-dire le bord de la phase stationnaire. La PRC est donc dans ce cas le rapport entre l'activité qui a migrée sur l'activité qui reste au point de dépôt, soit 78%.

Cette analyse iTLC permet donc d'identifier 2 ou plusieurs espèces mais qu'avec 2 possibilités : migration ou non. Elle permet également de quantifier les espèces formées.

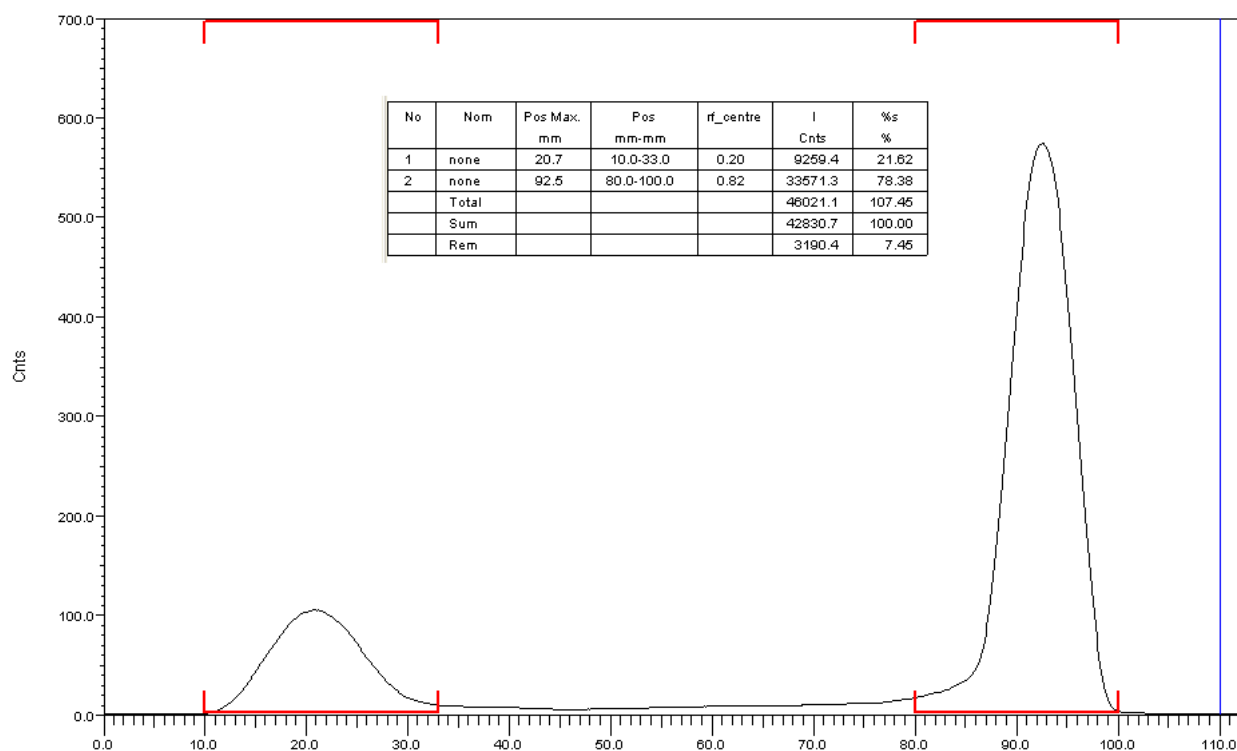


Figure 11 : Exemple de résultat obtenu suite à une analyse iTLC lue par un radiochromatographe

### 10.3. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide permet la séparation d'un ou plusieurs composés d'un mélange dans un double but d'identification et de quantification. Les solutés à séparer sont mis en solution avec un solvant puis mis dans la phase mobile, ou phase éluante. Cette phase est composée d'un ou plusieurs solvants. La phase mobile est entraînée par une ou des pompes hautes pression, ce qui lui permet de parcourir l'ensemble du système de chromatographie : la colonne qui est la phase stationnaire plus ou moins poreuse, puis le ou les détecteurs.

Le mélange à analyser se répartit entre la phase mobile ou la phase stationnaire en fonction de son affinité pour chacune. La phase stationnaire est non polaire (dans le cas d'une colonne C18) alors que la phase mobile est polaire.

En sortie de colonne, les différentes molécules sont caractérisées par différents détecteur, dans notre cas un détecteur UV et un détecteur de radioactivité, ce qui donne deux spectres de pics appelés chromatogrammes.

Les colonnes peuvent être de différents types, notamment le diamètre des pores qui diffère, mais elles sont en général faites de silice et le terme C18 correspond à un greffage d'une chaîne carbonée de 18 carbones  $(\text{CH}_2)_{17}\text{-CH}_3$  sur le gel de silice.

La phase mobile utilise différents solvants notamment l'acétonitrile, qui est un solvant organique avec une faible viscosité et l'eau. Le but du solvant organique est de désorber (détacher) les molécules de peptides de la surface hydrophobe adsorbante (la colonne). En augmentant lentement la concentration de solvant organique (gradient) jusqu'à ce que les polypeptides/peptides d'intérêt se désorbent et éluent (sortent de la colonne). En début d'analyse la phase mobile est donc majoritairement composée d'eau, puis les gradients s'échangent après quelques minutes afin de détacher le peptide d'intérêt. Des phases de plateaux permettent aux espèces chimiques de sortir petit à petit de la colonne. Le temps auquel le peptide d'intérêt se décroche de la colonne et passe dans les systèmes d'analyse correspond au temps de rétention ( $T_r$ ) qui sont une caractéristique de chaque peptide.

Les grandes différences avec l'iTLC sont que cette méthode permet d'obtenir une résolution plus élevée (24) et l'identification de plus de deux espèces chimiques dans la solution à analyser. Il est possible d'obtenir 3, 4 (ou plus) temps de rétention différents qui correspondent à autant d'espèces chimiques différentes.

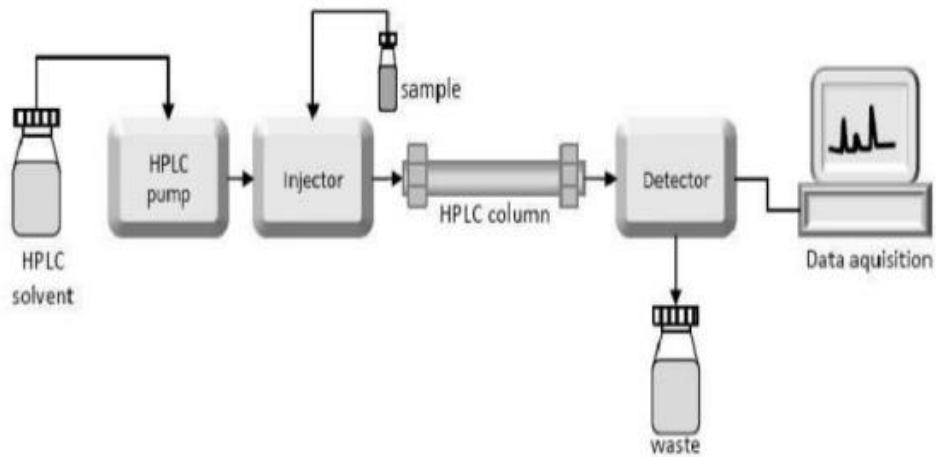


Figure 12 : Schéma d'une chaîne de montage HPLC (24)

Sur la Figure 13, on voit un exemple de chromatogramme double tel que ceux utilisés en radiopharmacie. Sur la partie haute il y a la détection de la radioactivité au cours du temps, et on peut voir clairement trois pics quantifiables sur cette figure, qui correspondent à 3 espèces différentes dans l'échantillon. Sur le dessous on voit le spectre UV associé.

Le tableau récapitulatif donne pour chaque région le temps de rétention (qui correspond au temps où la radioactivité détectée est la plus élevée) et son pourcentage de radioactivité sur la radioactivité totale détectée. Ici le premier pic est majoritaire à 73.8% avec un Tr de 8 :32.

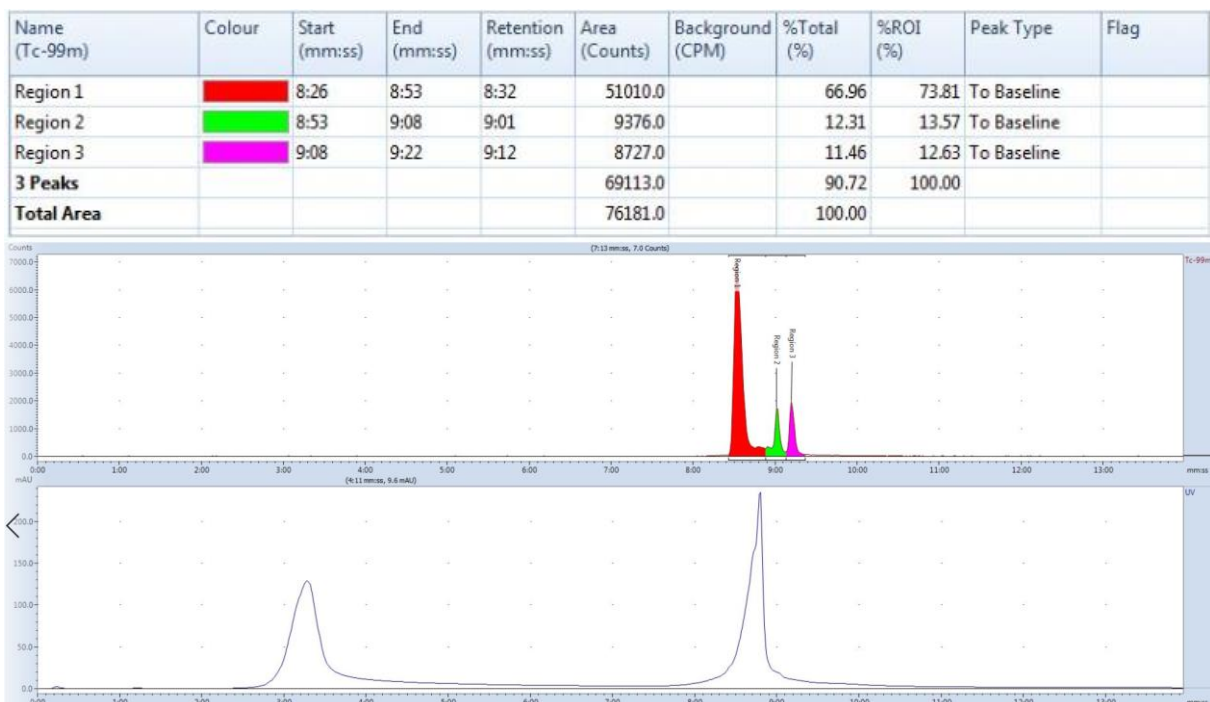


Figure 13 : Exemple de résultat obtenu suite à une analyse HPLC

# Article scientifique

L'article scientifique qui décrit ce travail n'a pas encore été publié, il est donc inséré dans une version très détaillée dans ce manuscrit de thèse.

## **Radiolabeling, characterization and biodistribution of $^{99m}\text{Tc}$ complexation by two chelates already synthesized as siderophors: *O*-trenox tris (8-hydroxy-quinoline) and *O*-trensox tris (8-hydroxy-5-sulphonate-quinoline)**

### 1. Introduction:

Siderophors are endogenous or exogenous molecules able to bind iron in its ionic and charged form ( $\text{Fe}^{3+}$  ion) (25). Many siderophors are synthesized with the aim of chelating excess iron, which is responsible for many organ toxicities in human. Trensox, for example, is compared to desferrioxamine on its anti-proliferative and apoptotic effects (26). These siderophors are also capable of chelating various other metals such as  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Al}^{3+}$  ions (27). These molecules should therefore be able to bind other charged metals. Some of these charged metals are used in nuclear medicine, such as gallium-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ) and technetium-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ). *O*-trensox chelation of gallium is already made and is nearly as efficient for  $\text{Fe}^{3+}$  chelation (28).

Technetium is a metal of the second series of transition elements belonging to group 7. Radioactive isotope of this metal,  $^{99m}\text{Tc}$  is widely used in nuclear medicine, particularly for diagnostic purposes in SPECT imaging.

*O*-trenox (Figure 14) is a molecule composed of single central nitrogen linked to 3 amine function, each linked to an 8-hydroxyquinoline. The TREN section tris(2-aminoethyl) of the molecule can bind to either position 2 or position 7 of the 8-hydroxyquinoline unit. In position 2 it is *O*-trenox (in position 7 it is *N*-trenox) and this work only concerns the complexation of *O*-trenox and *O*-trensox.

Complexation of technetium by an 8-hydroxyquinoline is already described in the literature (29,30) as well as with  $^{111}\text{Indium}$  and  $^{67}\text{Gallium}$  (31).

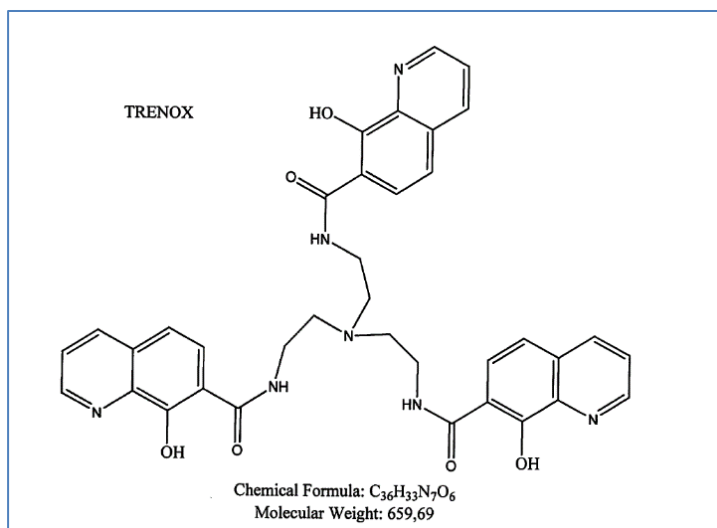


Figure 14 : Trenox chemical structure

O-trenox (Figure 15) have molecular weight of 965 g.mol, it is a tripod molecule containing three 8-hydroxy-5-sulphonate-quinoline and a tris (2-aminoethyl) amine (TREN) as an anchor. The difference between the two siderophors is the addition of a sulphonate group in position 5 of each hydroxyquinoline in trenox. As before, the TREN backbone is connecting through a trisamide moiety to the 2-position of sulfoxine to form O-trenox.

The amide connection in ortho position with respect to the hydroxyl group favors an initial strong coordination, which probably “preorganizes” the ligand for a full complexation of the metal by the three oxinate ligands (11).

Various known properties of already synthesized siderophors can help the transposition of this iron chelation to a chelation of technetium, our metal of interest. For example complexing ability is depending on pH (32). Others properties can provide information on the *in vitro* and even *in vivo* outcome of the future complexes with technetium (permeability and the biological activity of siderophors are dictated by their three dimensional structure and chirality) (10).

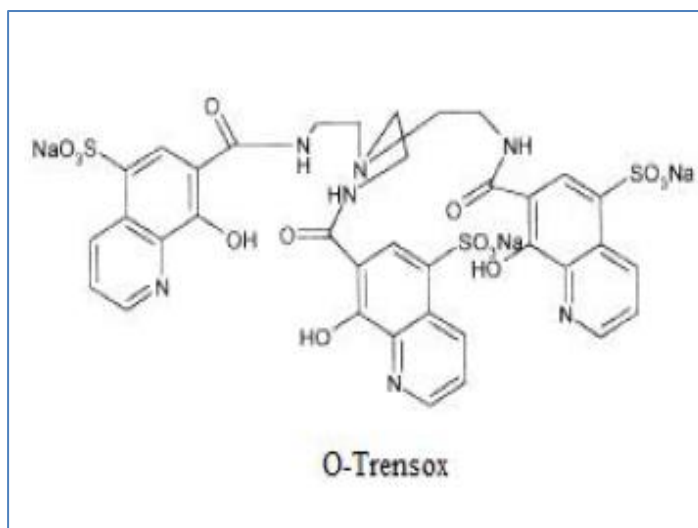


Figure 15 : Trensox chemical structure, chemical formula ( $C_{36}H_{30}N_7Na_3O_{15}S_3$ )

Trenox and trensox have suitable array of donor atoms for coordination with  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , due to this reason it could be easily labelled with pertechnetate (33). Based on these assumptions, synthetic siderophores appear to be good candidates for complexation of technetium $^{99m}$  for future medical application in diagnosis imaging.

Two different methods for technetium complexation were studied. First, indirect complexation with stannous reduction technique was proceeded via an intermediate ligand with low affinity for technetium. In a second time, HCl as a reducing agent was used to obtain  $^{99m}\text{TcCl}_6^{2-}$ , a technetium complex where no oxygen was directly linked to the central technetium atom. Identical complexes could be obtained by these two different methods and biological distribution could be similar (34).

The aim of this study is to highlight the potential complexation of  $^{99m}\text{Tc}$  with these two chelates. Initially, we will try to find the optimal conditions for radiolabeling these two siderophores with technetium-99m by varying numerous parameters (reducer, quantity of ligand material, pH, temperature, etc.). The complexation analysis will be carry out by evaluating the radiochemical purity with universally used techniques such as radiochromatography (HPLC and iTLC) (24). In a second step, we will evaluate different characteristics of these complexes such as lipophilicity, stability *in vitro*, *in vivo* or biodistribution in mice. Biodistribution of the composed complex is link to its physicochemical properties like hydrophilicity/lipophilicity of the radiolabeled compound. But is not the only factor could affect the overall *in vivo* performance (35). Other features such as charge, size and nature of functional groups present in the coordination sphere could also affect it more than to a future structural affinity for the target. Determining these properties can be interesting for chelates even if they are not yet couple to a biological vector yet.



All the results obtained will allow us to validate or not the use of these chelates for SPECT imaging. With the aim of complexation with Rhénium-188 (Beta- emitter), which has a coordination chemistry very close to  $^{99m}\text{Tc}$  (20,36), which would pave the way for the use of these chelates in theranostics (37,38).

## 2. Experimental part / Materials and methods:

### 2.1. Radiolabeling of trenox by technetium-99m

The synthesis of the chelates (trenox and trenox) was carried out by the Molecular Chemistry Department of Grenoble Alpes University and is not included in this article. Trenox was synthesized in the form of an orange powder with poor solubility in water. It was dissolved in anhydrous absolute ethanol (Carlo Erba reagents) and agitated in a vortex for 10 minutes until complete disappearance of visible particles. Due to his solubility characteristic (impossible to dissolve his particles in water), the influence of the solvent on the synthesis could not be studied for trenox. Concentrations obtained varied between 0, 5 to 1 mg/ml. Trensox was synthesized in the yellow powder form with a higher solubility in water. It could be dissolved in ultra-pure water (obtain with double osmosis) and no ethanol was required. Similar concentration as above was obtained.

Sodium pertechnetate ( $T_{1/2} = 6$  hours,  $E_{\gamma} = 140$  keV) was obtained by elution from a freshly eluted  $^{99}\text{Molybdenum}/^{99m}\text{Technetium}$  (TEKCIS, Cis Bio) generator. Eluate used must be less than one-hour old. Amount of pertechnetate applied vary between 100 and 1000 MBq in a NaCl (sodium chloride) volume ranging from 20 to 200  $\mu\text{L}$ , depends on how much time has passed since the last elution and the age of the generator.

Three reductive tin sources were used to reduce technetium to lower oxidation state: Tin chloride, Tin pyrophosphate and Tin tartrate. All three were used in aqueous solution at 1mg/ml in ultra-pure water.

As regards solvent in the reaction medium, trenox provided a large quantity of ethanol which was compensated by the NaCl provided by the pertechnetate and the pure water provided by the reducer. Finally, in trenox case 50% ethanol was targeted. An ultra-pure water/ NaCl mixture was used for the trensox.

Ligand and reducer were introduced into a sterile vial. The pH was checked with paper (Machery-Nagel) and adjusted if necessary with a 0.05M NaOH solution or a 0.5M acetate buffer solution at pH 4. Once the target pH was obtained, sodium pertechnetate was added and the pH was checked again. The mixture was mixed and either heated or left at room temperature for several minutes.

Factors influencing radiosynthesis such as amount of ligand (1 -1000 µg), amount of reducer (0.1 µg - 2000 µg) and its stabilizing ligand (chloride, pyrophosphate or tartrate), reaction time, pH of the solutions (4 -11) and reaction temperature (20 -70°) were studied with trenox in order to optimize the reaction conditions.

Radiosynthesis was also proceeded through  $^{99m}\text{TcCl}_6^{2-}$  with trenox to compare results of these two different methods: classic ligand exchange method and reducing technetium with hydrochloric acid (HCl). JK Amartei (39) work suggests that  $^{99m}\text{TcCl}_6^{2-}$  might serve a simple and highly versatile intermediate for the preparation of lipophilic technetium radiopharmaceuticals. This last one gives a technetium-containing intermediate that could in non-aqueous solution be complexes with liposoluble ligand.

Once the reaction conditions have been optimized with trenox, we are trying to achieve comparable results through trensox. The assumption was made that optimal conditions for radiosynthesis of the first chelate were transposable to the second chelate. This hypothesis was necessary due to the amount of experimentation carried out to obtain a workable complex.

## 2.2. Quality controls

The radiochemical yield and purity of  $^{99m}\text{Tc}$ -Trenox complex was determined by thin layer chromatography (iTLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). The following methods were used for indirect classic ligand exchange method. Quality controls used for method through  $^{99m}\text{TcCl}_6^{2-}$  were described in 2.3.

### 2.2.1. Thin layer chromatography

Chromatography is a physical method of separating the components of a mixture; it is based on differences in the affinity of substances for two phases, one stationary or fixed, and the other mobile. When coupled with a gamma radiation detection device, this analytical technique makes it possible to quickly find out whether a chemical change has taken place in the vial (23).

Analytical chromatography was performed on 8 x 1 cm strips of Whatman® 1MM pure cellulose paper, 0.16 mm thick. The eluent or mobile phase chosen was a 4:1 chloroform (Fischer chemical) ethanol (VWR International) mixture. A drop (5µL) of the complex was deposited 1 cm from the bottom edge of the support. After full migration (about 20 minutes in case of trenox) along the support, the strips were protected in Parafilm® and counted with the mini-GITA radiochromatographe (BGO-V-detector).

ITLC was also performed to analyze  $^{99m}\text{Tc}$ -trensox complex. Two complementary chromatographs were necessary in this case to isolate free technetium ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) and reduced technetium ( $^{99m}\text{TcO}_2$ ): iTLC-SG (Agilent technologies) 10x1 cm strips were used for both cases. First one used sodium chloride 0.9% as eluent, second one used a methyl ethyl ketone (MEC VWR international)/ ethyl-acetate (VWR international) 2:3 mix. Full migration was faster this time and completed in 5 minutes.

### 2.2.2. High performance liquid chromatography

Radiochemical purity was confirmed by a Shimadzu HPLC chain comprising 2 LC-20AD pumps and a SPD-20A UV spectrophotometer set at 254 nm. Each pump was connected with a different solvent (A = pure water, B = acetonitrile) and sent a proportion of each of the two solvents into the loop. This device was coupled to a LabLogic HPLC radio detector. The column used was a Kinetex 5 $\mu\text{m}$  XB-C18 100A, 50x 2.1 mm. It was eluted at 1ml/min by an ultra-pure water acetonitrile mixture whose proportions are shown in Figure 16.

High performance liquid chromatography also allows the identification of the complex and its radiochemical yield.

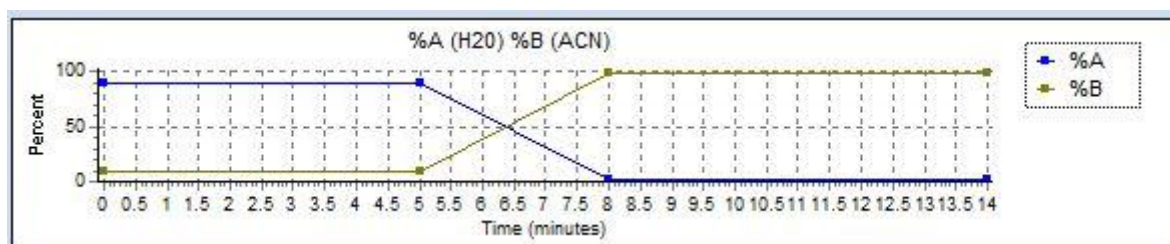


Figure 16 : HPLC analysis characteristics for both chelates

### 2.3. Indirect radio-synthesis via $\text{TcCl}_6$

Another radiolabelling method, which has been developed by Amartej et al (39), allowed technetium to be complexed indirectly via the form  $\text{TcCl}_6$ . The protocol used for this experiment was described as below. 0.5mL of HCL 12M and 0.1 mL of sodium pertechnétate (<100 MBq) were added in a sealed vial. Temperature rose to 80°C for 30 minutes with a dry bath. After degassing and cooling, a thin layer chromatography (on Whatman® cellulose 1MM) in HLC 0.6M was done to ensure the formation of  $^{99m}\text{TcCl}_6^{2-}$  in mixture reaction ( $R_f$  (retention factor) = 1) whereas impurities remained at the deposition point. If activity migration > 90 % (in practice 99.9% of  $\text{TcCl}_6$  is obtained) the hydrochloric acid was then completely removed by evaporation (20-30 minutes of heating at 90°). The dry residue of  $^{99m}\text{TcCl}_6^{2-}$  was redissolved in 200 $\mu\text{L}$  of trenox (300nmol) in anhydrous acetonitrile, followed by 10  $\mu\text{L}$  of an equimolar solution of triethylamine also in acetonitrile. This solution was again evaporated

to dryness, and then redissolved in 1 mL of chloroform. Then a double purification step with the addition of 1 mL of distilled water to the reaction flask, mixing and manual separation of the two layers of non-miscible phases.

#### 2.4. Reaction kinetics and *in vitro* radiochemical stability

The radiochemical yield of  $^{99m}\text{Tc}$ -trenox and  $^{99m}\text{Tc}$ -trensox were studied at different reaction times (5 min after mixing to 360 min). This allows us to know two characteristics: the speed of complexation and its long-term radiochemical stability in vial. For this purpose, after carrying out the radiolabeling we evaluated the radiochemical purity at different times with iTLC and HPLC.

#### 2.5. Partition coefficient determination

Partition coefficient ( $\log P$ ) defines if this is a lipophilic ( $\log P > 0$ ) or hydrophilic ( $\log P < 0$ ) complex. Lipophilicity is the key parameter for interpreting and predicting the transport of molecules across biological membranes. It also predicts absorption and other phenomena involved in the transport of metabolites (40). This property is usually measured by the division of a molecule between two phases, one organic and the other aqueous, corresponding to an immiscible two-phase system.

$\log P$  was determined by measuring the distribution of each radiosynthesized complex between octanol and phosphate-buffered saline (PBS). According to the protocol described by Carlotta (41) in a mixture of 500  $\mu\text{L}$  octanol and 500  $\mu\text{L}$  PBS, 20  $\mu\text{L}$  of the complex was added to a vial. After a one-minute vortexing, the vial was centrifuged at 13 000 rpm for 3 minutes to ensure complete separation of the two phases. The two phases were separated manually, and then this process was repeated by supplementing the octanol phase with 500  $\mu\text{L}$  of PBS and the aqueous phase with 500  $\mu\text{L}$  of octanol. The phases were separated again and the 4 vials were counted separately on the COBRA gamma counter (Packard). Values were verified with Motaleb (42) protocol.

The partition coefficient was finally the ratio of the radioactivity in the octanol to the radioactivity in the PBS according to the following formula:  $\log P = (\text{Total coup in octanol} / \text{total coup in PBS})$

#### 2.6. Charger Determination

To have an idea of the complex's load, a thin layer chromatography was performed on 3 different celluloses simultaneously: neutral Whatman® cellulose, negatively charged P81 phosphate cellulose (retains cations) and positively charged DE81 Diethylaminoethyl cellulose (retains anions). The

mobile phase used were (chloroform-ethanol 80:20 mix for trenox and MEC-éthyl-acétate 2 :3 mix for trensox. One drop (5  $\mu$ L) of each of synthesized complexes was deposited 1 cm from the lower edge of the cellulose, followed by complete migration to the upper edge. Each support was then removed from the tank, wrapped in Parafilm<sup>®</sup> and counted with the GITA radiochromatographe. Knowing the overall charge of the complex formed between technetium and chelate makes it possible to find out more about the coordination of the metal with the ligand and its final oxidation degree.

## 2.7. In vitro stability of the complex in contact with human blood

Radiolabeling described above was diluted if necessary in pure water to obtain a maximum of 10% ethanol in the final volume to avoid the occurrence of hemolysis. Complex was mixed with blood in a heparinized tube to obtain a final concentration between 20 and 60 MBq/ml. The tube was incubated at 37°C to reproduce body temperature. After manual homogenization, a 500  $\mu$ L blood sample was taken at each time. T0 point corresponded to immediate time after label/blood contact but without incubation. Each sample was centrifuged at 4000 rpm for 3 minutes. Blood cells (at the bottom of the pellet) were separated from the plasma (supernatant) and the activity of the two phases was measured separately in activimeter chamber (Medisystem<sup>®</sup>).

Trichloroacetic acid (TCA) was added to precipitate the plasma proteins in plasma tube. The correct amount of TCA added had been determined at 30  $\mu$ L of TCA 20%: at these values, there was no precipitation of the radiolabeling product. After homogenization, a new centrifugation was performed at 13 000 rpm for 3 minutes. The two phases were separated again and measured separately to estimate the binding of the tracer to plasma proteins (agglomerate at the bottom of the pellet which resembles a solid phase). The supernatant was re-injected by HPLC under the same conditions described in 2.2.2 to ensure radiochemical purity was maintained and possibly to assess the formation of secondary metabolites.

This part gives information on bioavailability of the complex: binding to blood cells and plasma proteins. It also allows the evaluation of radiochemical purity of technetium-chelate after incubation in the blood and therefore evaluates his in-vitro radiochemical stability.

## 2.8. Animal experimentation: biodistribution and imaging

Same as above, a dilution was carried out in order to reduce the amount of ethanol (at 10% maximum) present in the mixture with trenox and to obtain the right range of administered volume activity, approximately 20 to 40 MBq in 100 to 200  $\mu$ L solution. This volume was compatible with the

estimated blood volume of the mice and the activity with the sensitivity of the gamma detector and SPECT imaging. But reducing quantity of ethanol was risking destabilization or aggregation of the chelate-technetium complex.

The biodistribution study was performed in three groups, each group contain four male mice Swiss weighs 35 to 40 g. The radioactive solution was injected in the tail vein and the animals were sacrificed at 30, 60, and 240 min after injection. Blood samples were obtained by the puncture of the heart and urine samples by pressing bladder. Other organs were removed and counted in gamma counter (Perkin Elmer) and expressed as a percent injected dose (ID) per gram of removed organ (% ID/g). Blood and muscles were assumed to be 6 and 40% of the total body weight (43,44).

3 mice of the 240 min group were also put under the Nano SPECT/CT (gamma camera coupled to the scanner) at 30, 60 and 240 minutes before being sacrificed in order to visualize the distribution of the complexes *in vivo* under imaging conditions.

### 3. Results and discussion:

#### 3.1. Optimal conditions for synthesis

##### 3.1.1. Type and quantity of reducer

Tin chloride is often used as a reference reducer (45) to reduce the pertechnetate ion from the (+VII) oxidation degree to lower levels. This forms empty “d” orbitals that will allow it to bind to electron donor ligands. In our tests, it appeared that SnCl<sub>2</sub> led to the formation of a non-negligible amount of TcO<sub>2</sub>, identifiable on iTLC at R<sub>f</sub> 0-0.2. This TcO<sub>2</sub> was problematic for us because it was no longer mobilizable for complexation with the ligand. The radiochemical purity reached a maximum of 90% in this case. These results were compatible with those obtained by Apparau et al (17) showing a maximum complexation of 90% with SnCl<sub>2</sub>. In the same study, the authors showed total complexation (100%) with pyrophosphate or stannous tartrate as a reducing agent, without significant TcO<sub>2</sub> formation. In others works to form <sup>99m</sup>Tc-immunoglobulins, replacement of SnCl<sub>2</sub> by Sn(II)-tartrate has been shown to reduce the amount of radiocolloid formed (46). Moreover, this impurity (reduced and hydrolyzed TcO<sub>2</sub>) remained stuck on our chromatographic column (at the top) and disturbed our analytical analysis. Tin chloride was therefore abandoned, and we will subsequently use stannous pyrophosphate (P<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>4-</sup>)<sub>2</sub>Sn, which gave us experimentally the same results as stannous tartrate.

This synthesis finally appeared to be indirect with first of all the reduction of technetium to a lower oxidation state allowing the formation of an intermediate complex of technetium pyrophosphate. In

a second step, the ligand took the place of the pyrophosphate to complex the technetium. A ligand exchange reaction was carried out: the water molecules of the first complex and the donor atoms (nitrogen and oxygen) of the chelate were substituted.

As shown in the Table 3 below, the amount of  $(P_2O_7^4)_2Sn$  necessary was small but superior to ligand amount. We had the best synthesis yields for about 25 to 50  $\mu g$  of stannous pyrophosphate. At very high amounts of pyrophosphate, technetium-pyrophosphate became important, because the ligand supplied was no longer in sufficient quantity to shift the equilibrium in its favor despite its higher affinity (47).

In the absence of reducing agent, it was shown that complexation did not take place: no migration to iTLC ( $R_f = 0 = 99.8\%$ ) and after injection in HPLC, two peaks came out with the dead volume of the column with retention times comparable to those obtained with pertechnetate alone.

Due to similar ligands, same quantity of reducer will be used with trenox.

Pyrophosphate Sn ( $\mu g$ )	$^{99m}Tc$ -trenox yield (%)
0,1	4
0,5	50
1	93,9
5	96,6
25	98,5
50	98,7
100	97,9
500	96,5
1000	95
2000	78

Table 3 : Variation of the radiochemical yield of  $^{99m}Tc$ -trenox as a function of pyrophosphate amount

### 3.1.2. Amount of ligand

The amount of ligand is essential to ensure proper complexation with technetium $^{99m}$  and depend on chelate structure: 2 to 10  $\mu g$  are required for  $^{99m}Tc$ -Sn (II) complexes of novel quinoline derivative (48) and 1.5 mg for another  $^{99m}Tc$  quinoline complex (45). In absence of ligand or inadequate amount, the reduction of pertechnetate ion in aqueous solution leads to cationic species evolving rapidly towards the formation of  $TcO_2$  or its hydroxylated forms. Under similar reaction conditions (pH 6, 50  $\mu g$  tin pyrophosphate, 50  $\mu L$   $Na^{99m}TcO_4^-$  and 50% ethanol in final volume) different quantities of trenox were involved. Variation in the final yield of  $^{99m}Tc$ -trenox as a function of the

amount of trenox is illustrated below in Figure 17. Experiment started with 1  $\mu\text{g}$  of trenox to a maximum of 1000  $\mu\text{g}$  but results with an amount of trenox greater than 100  $\mu\text{g}$  are not shown in the Figure 17 for the following reason.

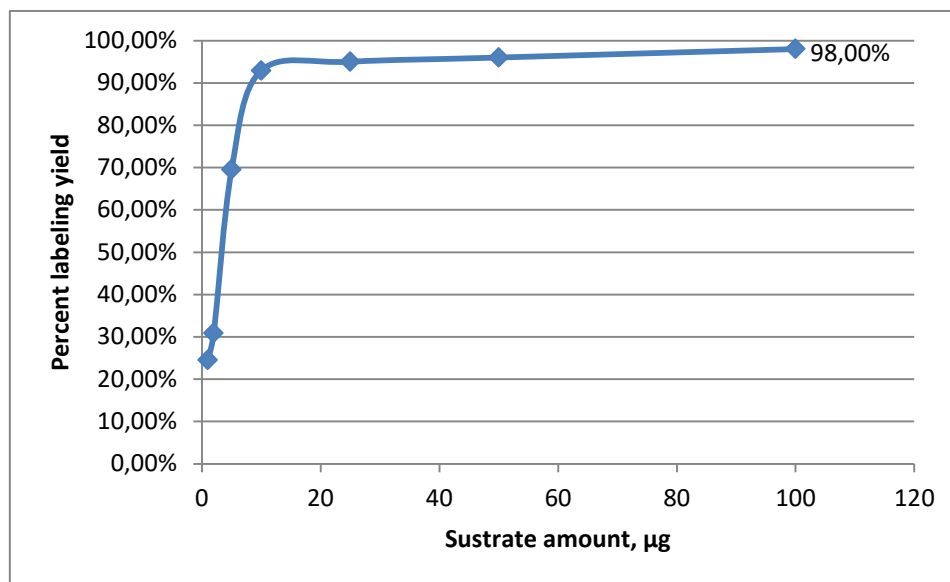


Figure 17 : Variation of the radiochemical yield of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -trenox as a function of trenox amount (n=3)

Above 100  $\mu\text{g}$  of trenox (= 150 nmol), the radiochemical yield stabilized exceeding 98 %. At this stage, adding more ligand did not significantly improve radiochemical purity. Optimal amount of ligand to used could be defined and it is therefore 150 nmol.

Retrospectively a quick check was made of the possible transposition of these results obtained with trenox to trensox. Increasing quantities of trensox were involved and the resulting radiochemical purities are expressed in figure 18. Trenox and trensox curves were similar in maximum yield reached and in the order of amount of chelate necessary to achieve it. We noticed that in order to obtain an acceptable yield (> 95%) it was necessary to increase the intake of trensox compared to trenox indeed 200  $\mu\text{g}$  of trensox gave maximum purity either double of trenox amount necessary for equivalent yield.



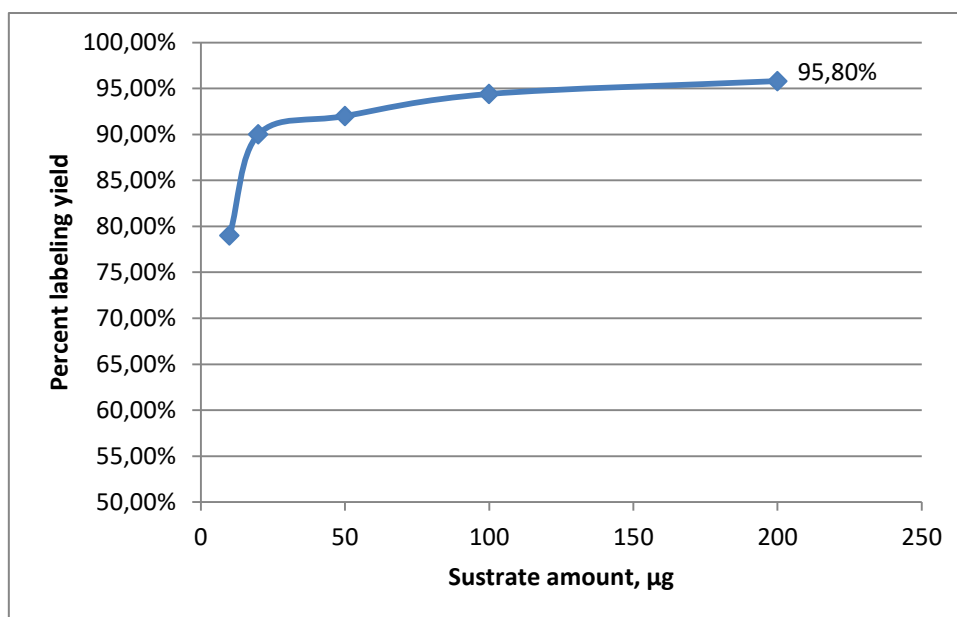


Figure 18: Variation of the radiochemical yield of  $^{99m}\text{Tc}$ -trenox as a function of trenox amount ( $n=1$ )

It is necessary to come back here to the solvent involved in the solution of the chelate. Indeed, pure water was used for trenox while pure ethanol is used for trenox. Complexation reaction with trenox was also carried out in a 50/50 water ethanol mixture and with quantitatively different NaCl inputs by the pertechnetate. In all these situations radiochemical purity in iTLC was greater than 95%. Consequently, there was no solvent influence in this reaction. To allow the easiest possible analyses, 50% ethanol was kept for the trenox and for convenience no ethanol was used for trenox (just ultra-pure water/NaCl).

### 3.1.3. Effect of pH

As described by Motaleb (45) and others publications (33,47,48) pH influences formation of chelate-technetium species. Data obtained at different pH values are expressed in the table 4 below. Maximum radiochemical yield was obtained at pH 6, which was the pH of our reaction without adjustment. Acidified to pH 4 the radiochemical yield decreased to 93.7 %. The higher the pH was increased from 8 to 10, more the yield decreased and thus a significant appearance of impurities (free pertechnetate or hydrolyzed technetium) was observed which did not complex. The iTLC analysis cannot tell which of these two impurities was predominantly formed when the pH was increased because both remain at the deposition point. However alkaline medium is a good medium for stannous hydroxide colloid formation (47), so it could be this impurity which was predominant at pH superior to 8.

In HPLC, we observed presence of a peak at the retention time of pertechnetate which increases with pH, with up to more than 40% of  $\text{TcO}_4^-$  identifiable. A slower one was visible at acid pH but this can be explained by a still good purity at this pH level. High or low  $\text{OH}^-$  concentration could be responsible for partial hydrolysis of the complex and oxidation of reduced-technetium to  $\text{TcO}_4^-$  or  $\text{TcO}_2$  resulted in a decrease in radiochemical purity. This  $\text{TcO}_2$  amount was not quantifiable in HPLC because it flowed badly out of the column with random indeterminate peak.

Both methods of analysis showed that impurities increased with pH. An acidic pH was also responsible for less radiochemical purity than at pH 6 (maximum yield). The nature of the major impurities per pH point remained unknown. The reference pH for synthesis with both chelates was chosen as the one of the solution without adjustment, i.e. pH 6.

pH value (n=3)	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -trenox yield (%)
4	93,7 ± 2,5
6	98,3 ± 0,6
8	78,2 ± 5,9
9	67,3 ± 2,5
10	29,5 ± 0,7

Table 4 : Effect of reaction medium's pH on the radiochemical yield of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -trenox in ITLC (mean+/-SD) (n=3)

### 3.1.4. Temperature

Exchange of molecules can be a slow or partial at room temperature. Heating is therefore necessary to check if high temperature improves the speed of complex formation or its maximum radiochemical purity. The labeling was heated immediately after synthesis to 60-70°C for 20-30 minutes to evaluate temperature impact on reaction. At all pH levels tested (4, 6, 8, 9 and 11) and with all tested combinations of quantity/type of reducer, heating did not improve the radiochemical yield in iTLC. The heating was therefore not maintained and the ideal reaction temperature was defined as the ambient temperature, i.e. about 25°C.

## 3.2. Identification and radiochemical purity of the compound: ITLC and HPLC analysis

### 3.2.1. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Trenox

Chromatographic paper used was Whatman® 0,16MM in pure cellulose due to no hydrophobic interaction between ligand and support unlike Machery-Nagel plastic support. This one retained

<sup>99m</sup>Tc-trenox along the support that causes the analysis to lose quality. Complex formed between trenox and technetium being probably of intermediate polarity (compound of amine function) it was necessary to use an eluent of increasing polar character like chloroform. Mixture chosen after different tests was chloroform-ethanol 4:1, there is 20% polar eluent (ethanol) and 80% chloroform (halogenated aliphatic hydrocarbon). The chromatographic analysis of each species under the given conditions is summarized in the table 5.

Under the conditions described in 2.2.1.1, all the impurities remained at the deposition point while the complex formed migrates towards the strip. These conditions of chromatography on thin layer (support and eluent) allowed to correctly isolate the complex of interest formed (<sup>99m</sup>Tc-trenox) and to specify its radiochemical yield around 97-98% (Figure 19). It should be noted that the presence of oxygen in the medium could theoretically re-oxidise the technetium into pertechnetate with time-dependence. This could be verified with the stability study.

HPLC analysis provided confirmation of complexes existence. It also allowed checking if there were other isolable impurities and finally confirmed the radiochemical purity obtained in iTLC. Pertechnetate alone and trenox alone were injected in the same conditions to get their standard retention times. Retention time of pertechnetate was 0:15 (min: sec) and retention time of trenox cold was 8:46 with a large, thin and unique UV peak. Reduced and hydrolyzed technetium was difficult to identify and to get out the column.

HPLC radiochromatogram presented in Figure 20 confirms complex identification and radiochemical yield. Retention time of free technetium and UV signal of both free technetium and trenox alone were well known. The first peak (<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> /pertechnetate /free technetium retention time 0:15) was inexistent, while the second peak (retention time 8:47) corresponds to <sup>99m</sup>Tc-trenox complex, which was found to coincide with the UV signal of trenox alone (also 8:46). Based on this radiochromatogram, radiochemical yield was 99.6%. This analysis did not reveal any other impurities.

Species	Rf: 0 (%)	Rf: 0.8 – 1 (%)
TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	100	0
TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup> + reducer	100	0
TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup> + ligand (trenox)	100	0
TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup> + reducer + ligand (trenox)	< 3	> 97

Table 5 : Chromatographic analysis of each species on Whatman 0.16MM paper in a 4:1 Chloroform - Ethanol mixture

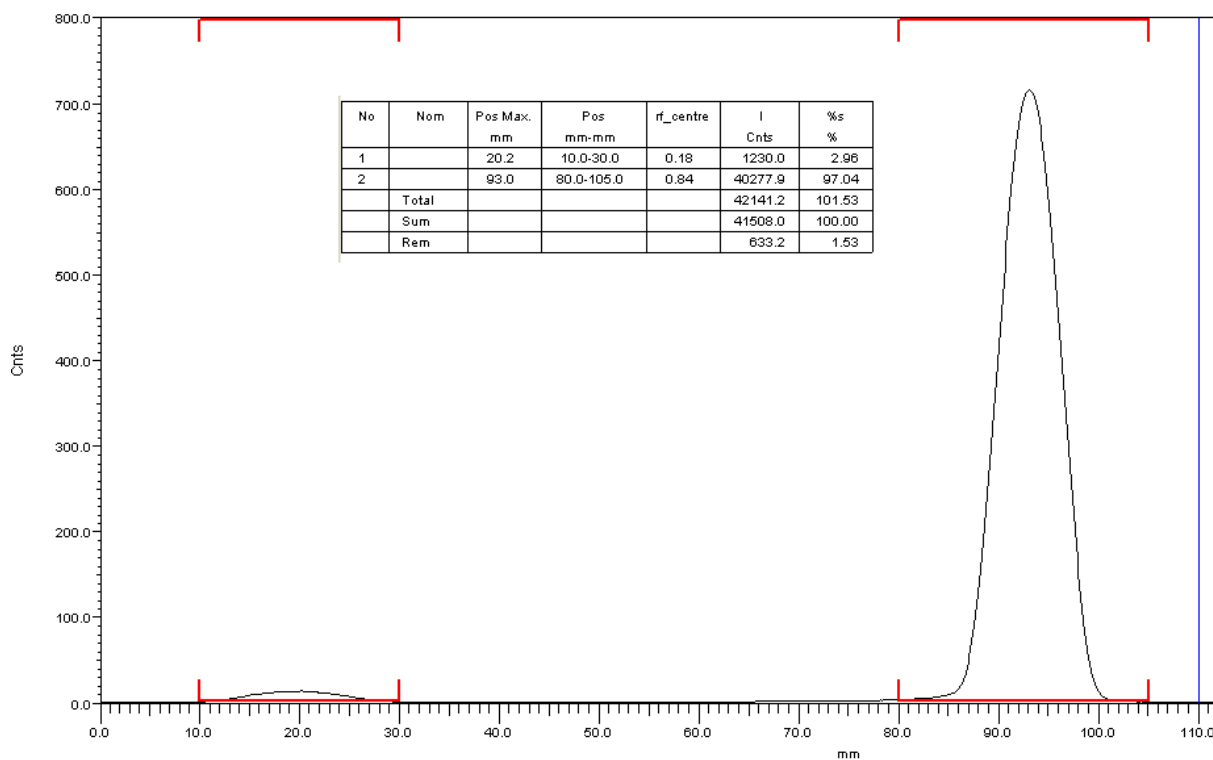


Figure 19 :  $^{99m}\text{Tc}$ -trenox chromatographic analysis on Whatman 0.16MM paper in a 4:1 Chloroform – Ethanol mixture

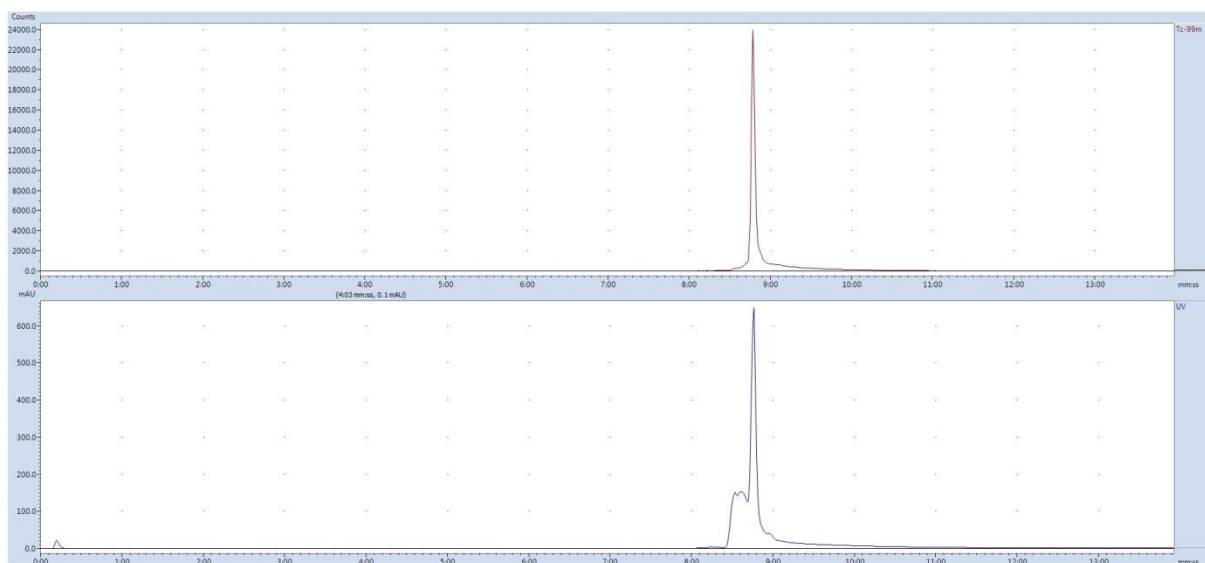


Figure 20 : Radiochromatogram HPLC of  $^{99m}\text{Tc}$ -trenox (total counts in red and mAU in blue)

### 3.2.2. $^{99m}\text{Tc}$ -Trenox

Trenox did not present polarity problem and hydrophobic interaction with support. Chelate was hydrophilic and migrates well in solvents conventionally used in iTLC as well as on silica gel supports. However, a single iTLC could not isolate the complex of interest (chelate-bound technetium) from the two impurities of concern (reduced technetium and free technetium). On a conventional silica gel support, free technetium or pertechnetate ion migrated completely into the eluent conventionally

used ( $R_f$  0.8-1), i.e. into 0.9% Sodium Chloride or MEC/ethyl-acetate. While hydrolyzed reduced technetium remained at the deposition point ( $R_f$  0-0.2) in these same two eluents. In MEC/ethyl-acetate, our complex did not migrate contrary to NaCl 0.9% as mobile phase. It was therefore necessary to combine two ITLC-SG using two different mobile phases to identify and determine radiochemical yield (table 6). ITLC-SG with MEC/ethyl-acetate isolated free pertechnetate and ITLC-SG in NaCl 0.9% isolated reduced technetium.

Finally, radiochemical yield of  $^{99m}\text{Tc}$ -trensox was calculated with the following equation: 100 – free pertechnetate ( $R_f$  0.8-1 in the first TLC) – reduced technetium ( $R_f$  0 in the second TLC).

Species	developing phase MEC/ethyl-acetate		developing phase NaCl 0.9%	
	Rf: 0 (%)	Rf: 0.8 – 1 (%)	Rf: 0 (%)	Rf: 0.8 – 1 (%)
$\text{TcO}_4^-$	0	100	0	100
$\text{TcO}_4^-$ + reducer	100	0	100	0
$\text{TcO}_4^-$ + ligand (trensox)	0	100	0	100
$\text{TcO}_4^-$ + reducer + ligand (trensox)	>99	<1	<4	>96

Table 6 : Chromatographic analysis on silica gel paper in two different developing phases

There was almost no free technetium (<1 %) and a small amount of reduced hydrolyzed technetium, which gave a final radiochemical purity higher than 95%.

HPLC analysis of  $^{99m}\text{Tc}$ -trensox was difficult. Several column/eluent combinations had been tested with no possibility of the complex emerging of the column to be counted. Finally, the same column and gradient as trenox were used, radiochromatogram is in figure 21. The formed complex came out of the column with the dead volume (retention time 0:16). UV peak (corresponding to cold trensox 0:13) was in coincidence with the radio peaks and there were no further peaks after. It was assumed that this peak corresponded to both  $^{99m}\text{Tc}$ -trensox and free pertechnetate.



Figure 21 : Radiochromatogram HPLC of  $^{99m}\text{Tc}$ -trensox (total counts in red and mAU in blue)

### 3.3. Results with indirect synthesis via $^{99m}\text{TcCl}_6^{2-}$

Since the chemistry of technetium is very varied, another possibility in its synthesis is to use a different intermediate for reduced technetium. This synthesis intermediate is  $^{99m}\text{TcCl}_6^{2-}$ .

As we have seen, the reduction of technetium has a lower valence degree, therefore going from degree (+VII) to technetium (+III) and/or (+IV) and/or (+V) is an essential and indispensable step in the preparation of most technetium-based radiopharmaceuticals. The reducer of choice is the stannous ion ( $\text{Sn}^{2+}$ ) which is in fact largely in excess of the quantities of technetium. Some publications have studied the feasibility of using hydrochloric acid HCl as a reducing agent. Although little described and very little used in routine clinical practice, this use of HCl as a reducing agent nevertheless has many qualities. After neutralization of the excess HCl, the only other chemical species present in the reduced technetium solution is NaCl, which is contained in the eluate obtained from the generator ( $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4^-$ ). There are therefore no stannous ions in the medium. It is known that this stabilizing ligand interacts with technetium by creating low affinity complexes. In the concentrated hydrochloric acid/vacuum evaporation method no metallic reducing cation is applied, and no  $^{99m}\text{Tc}$ -metallic cation radio-colloid may be formed (18). Avoiding these species therefore makes it possible to "simplify" the various chemical reactions that probably occur in the reaction medium. Moreover, under the appropriate conditions, it would seem that a single species of reduced technetium is created using concentrated hydrochloric acid, thus a single oxidation state (19). The synthesis process is more complex, but does not require the addition of oxygen (no water left).

The radiochemical purity reached 96.7% pre-purification and 99% after purification. Some of the impurities were removed by the purification and remain stuck in the soluble phase. This was a rate higher than the best rate obtained by classical synthesis with the reducer. In HPLC, pre- and post-purification we had a peak with an identical retention time to that obtained by the classical radiosynthesis method (figure 22). It can be hypothesized that the oxidation states of the technetium cores and, more generally, the complexes formed are identical whatever the reducer used (HCl or Tin).

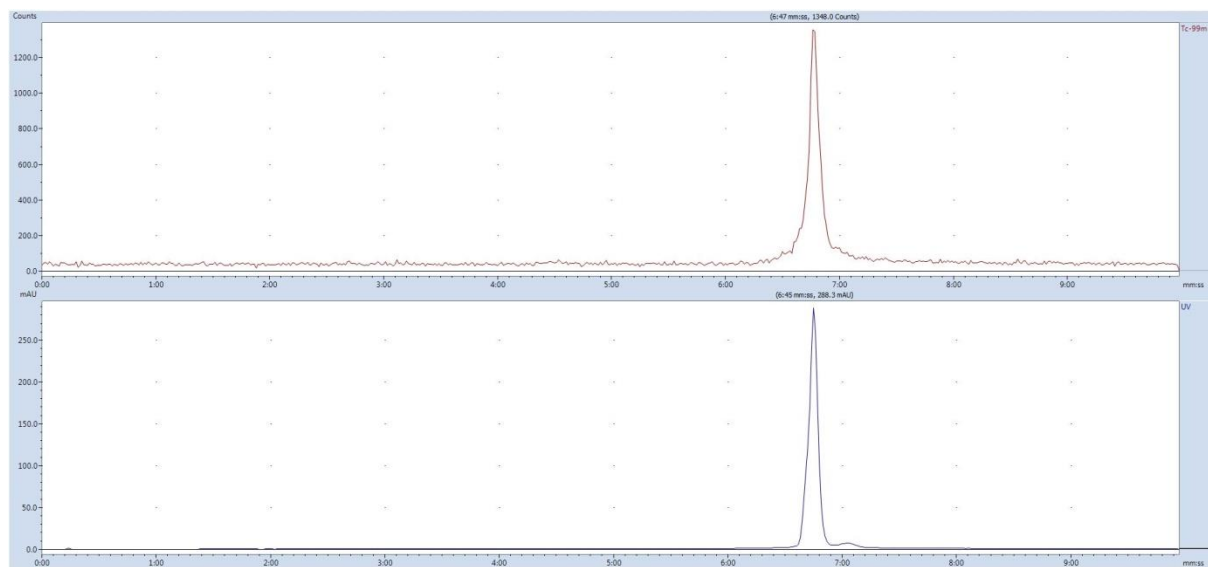


Figure 22 : Radiochromatogram HPLC of  $^{99m}\text{Tc}$ -trenox via  $^{99m}\text{TcCl}_6^{2-}$  (total counts in red and mAU in blue)

### 3.4. Reaction kinetics and in vitro radiochemical stability

#### 3.4.1. $^{99m}\text{Tc}$ -trenox

Radiopharmaceuticals employed in nuclear medicine have a relatively short period of use. Production must be fast and maximum radiochemical yield must be reached quickly. Reaction kinetics (complexation speed) as well as its stability in the reaction vial (time during technetium remains complexes with trenox) are important data for a new radiotracer. From the point of view of clinical use, a short synthesis reaction allows a rapid injection to the patient and thus limits problems of radioactive decay. A long stability avoids formation of impurities (by decomplexation or degradation) between radiosynthesis and injection. Impurities formation or complex demetalation after injection will be evaluated by in vitro stability in blood and by biodistribution in animals.

HPLC and iTLC results in Table 7 show a very fast trenox reaction on pertechnetate in less than 5 minutes at room temperature. In iTLC, the migration time (about 20 minutes) of the solvent must be considered and complexation may continue slightly during the analysis.

Maximum radiochemical yield was quickly succeeded (30 minutes) and complex was stable for at least 6 hours. For comparison Gharibkandi et al (49) work on  $^{99m}\text{Tc}$ -oxine demonstrate high radiochemical purity (RCP ~ 100%) and stability (RCP > 97% at 24 h).

Reaction time (min)	$^{99m}\text{Tc}$ -trenox yield (%)	
	ITLC (n=3)	HPLC (n=1)
5	98,3 ± 0,2	99,6
30	98,5 ± 0,2	99,4
60	98,0 ± 0,4	98,6
180	97,4 ± 0,4	97,8
360	96,6 ± 1,4	97,5

Table 7 : Effect of the reaction time on the radiochemical yield of  $^{99m}\text{Tc}$ -trenox in ITLC (n=3) and HPLC (n=1)

#### 3.4.2. $^{99m}\text{Tc}$ -trensox

At 5 minutes, reaction seemed to be random with high standard deviation, minimum at 62 % and maximum at 86 %. 5 minutes were not sufficient to obtain an effective radiolabeling. So we took 30 minutes as reference time for this complexation. Comparatively, trensox took much time to complex pertechnetate with maximum radiochemical yield obtained in 30 minutes. Trensox complex seemed to be slightly lesser stable because the yield falls below 90 % 6 hours after synthesis (table 8). When studying biodistribution in mice, it can be checked if the same thing happens in 240 min mice group. HPLC analysis was note accurate because any impurities that may form were coincident with the trensox peak or do not came out of the column.

Reaction time (min)	$^{99m}\text{Tc}$ -trensox yield (%)
	ITLC (n=3)
5	77 ± 13,1
30	94,8 ± 0,6
60	93,9 ± 0,9
180	91,9 ± 2,7
360	87,8 ± 5,9

Table 8 : Effect of the reaction time on the radiochemical yield of  $^{99m}\text{Tc}$ -trensox in ITLC (n=3)



### 3.5. Complex partition coefficient log P

The calculated hydro-lipophily ( $n=3$ ) of  $^{99m}\text{Tc}$ -trenox complex equal to 1.4 [1.37; 1.49].  $^{99m}\text{Tc}$ -trenox complex was therefore lipophilic, which may allowed it to pass the blood-brain barrier (40) and distribute itself to the brain. This hypothesis could be confirmed by injecting into mice during the animal experiment. In addition, due to this characteristic this tracer should have hepatic elimination. This result was predictable because trenox alone was already difficulty miscible in water as shown in the experimental part. It sticks to the surfaces used, such as the glass of vials and syringes.

On the contrary, calculated lipophilicity ( $n=3$ ) of  $^{99m}\text{Tc}$ -trensox equal to -2.5 [-2.6; -2.35]. The complex was hydrophilic and elimination should be urinary and renal. Presence of sulphonate group on the quinolone ring increases aqueous solubility (30).

### 3.6. Complex's charge

This global charge is very important for the becoming and in vivo behavior of the complexes obtained (50), because it influence their lipophily. If these complexes are neutral they should be lipophilic (20). It is also important to know the degree of oxidation of the technetium core. It depends not only on the nature of the ligands but also on the pH of the solution in the case of complexes that may exist in an acid or basic state (14).

The results of ion exchange chromatography were expressed in table 9. Trenox complex migrated in the same way on the three different supports. There was no retention of loaded species. Trenox-technetium complex was therefore not charged and neutral. Following the complexation of technetium by trenox, the 3 oxygen atoms (one on each 8-hydroxyquinoline) with deprotonating became phenolates, therefore negatively charged. As the complex was neutral, the technetium was probably in the +III oxidation form.

For trensox, the radiolabelled complex with technetium was retained by the DE81 positive cellulose while it migrated to the neutral cellulose as well as to the P81 positive cellulose. We concluded that the complex was negatively charged because of additional sulphonate on trensox aromatics groups which can become negatively charged in case of deprotonating. The technetium was once again at oxidation degree +III. There were 6 connections between technetium and each chelate via 3 oxygens and 3 nitrogen atoms. The two complexes were hexacoordinate and the geometry was octahedral.

The charge of a complex is one of the factors that can greatly influence its excretion: charged complexes tend to be eliminated by the kidneys, unlike neutral complexes. It can be expected the  $^{99m}\text{Tc}$ -trensox to be eliminated by renal excretion, and not the  $^{99m}\text{Tc}$ -trenox.

	P81 negative		DE81 positive		Whatman® neutral	
	Rf=0 (%)	Rf=0.8-1 (%)	Rf=0 (%)	Rf=0.8-1 (%)	Rf=0 (%)	Rf=0.8-1 (%)
<sup>99m</sup> Tc-trenox	10,5 ± 2,3	89,5 ± 2,3	9,5 ± 2,5	90,5 ± 2,5	2 ± 0	97,3 ± 0,6
<sup>99m</sup> Tc-trensox	8,5 ± 1,7	91,8 ± 2,0	95,3 ± 5,5	4,8 ± 5,5	11 ± 2,8	89,0 ± 2,8

Table 9 : Complex migration on different thin layer chromatography (mean +/- SD) (n=3)

### 3.7. *In vitro* stability of the complex in contact with blood

#### 3.7.1. <sup>99m</sup>Tc-trenox

It ensures the stability of the synthesized complexes in contact with human blood over time. Demetalation of the complex or creation of secondary metabolites in contact with blood are possible and must be quantifiable. This study also assessed the binding of the complex with red blood cells and plasma protein in order to determine whether there was a non-specific fixation on the blood cells. The binding to plasma proteins is important because only the molecule in its free form can reach its membrane or intracellular target to be active. Binding of the complex to plasma proteins could prevent the passage of the membrane, which could reduce the diffusion of the tracer in the tissues. In table 10, results at each time (0 to 180 min) of binding to blood cells and proteins and *in vitro* metabolism of <sup>99m</sup>Tc-trenox.

On average of 54 % [42-75 %] of total activity was in the blood cell. In addition, a strong binding of the complex to plasma proteins was observed. Only a small part of the injected activity would be available for immediate distribution to the different body organs i.e. about 30% of the 46% present in the plasma.

Retention time of complex was similar over the times. Radiochemical yield decreases rapidly with time spend on blood contact. After 180 minutes, only 70 % had lefts and 4 impurities as unidentified chemical forms appeared. These peaks had different retention times from free technetium, meaning there was no demetalation. We found the same retention times for unidentified chemical forms at each time with their activity gradually increasing as the labeling was in contact with blood. These indeterminate chemical forms were probably the effect of the blood components on the complex.

This could be problematic for *in vivo* use, and these data will be compared with those obtained in the biodistribution assessment in mice.

Time since contact with blood (min)	Blood cell binding (%)	Plasma protein binding (%)	Retention time <sup>99m</sup> Tc-trenox (min: sec)	Radiochemical yield (%)	number of other peaks	Impurities (%)
T0	-	-	10:28	98,2	0	1,8
T30	56	78	10:28	93,4	2	6,6
T60	55	73	10:28	88,7	3	11,3
T90	42	79	10:35	84,8	4	15,3
T120	53	74	10:28	78,7	4	21,3
T150	43	77	10:32	75,7	4	24,3
T180	75	62	10:40	70,2	4	29,8

Table 10 : Binding to blood cells and plasma proteins and *in vitro* metabolism of <sup>99m</sup>Tc-trenox

### 3.7.2. <sup>99m</sup>Tc-trensox

In trensox case in table 11, mean blood cell binding over the whole time was 26 %. More chelate-technetium was found in plasma where plasma protein binding averaged 59 %. Trensox allowed a greater diffusion of the complex than trenox. HPLC analysis was not relevant here because the peak corresponding to free technetium is concomitant with <sup>99m</sup>Tc-trensox peak. It could have a decomplexation that would not be seen on the chromatogram. It would have been necessary in this precise case to associate HPLC with iTLC to have more information. There were comparatively less other unknown species formed than with trenox. Biodistribution in mice could be able to make up for this missing information.

time since contact with blood (min)	Red blood cell binding (%)	Plasma protein binding (%)	Retention time <sup>99m</sup> Tc-trensox (min: sec)	Radiochemical yield (%)	number of other peaks	Impurities (%)
T0	-	-	00:17	97,5	0	2,5
T30	24	51	00:17	95,0	0	5
T60	24	66	00:17	88,2	0	11,8
T90	30	40	00:17	85,1	0	14,9
T120	25	60	00:17	81,6	0	18,4
T150	30	68	00:17	78,2	1	21,8
T180	23	69	00:17	74,0	1	26

Table 11 : Binding to blood cells and proteins and *in vitro* metabolism of <sup>99m</sup>Tc-trensox

### 3.8. Animal experimentation: biodistribution and imaging

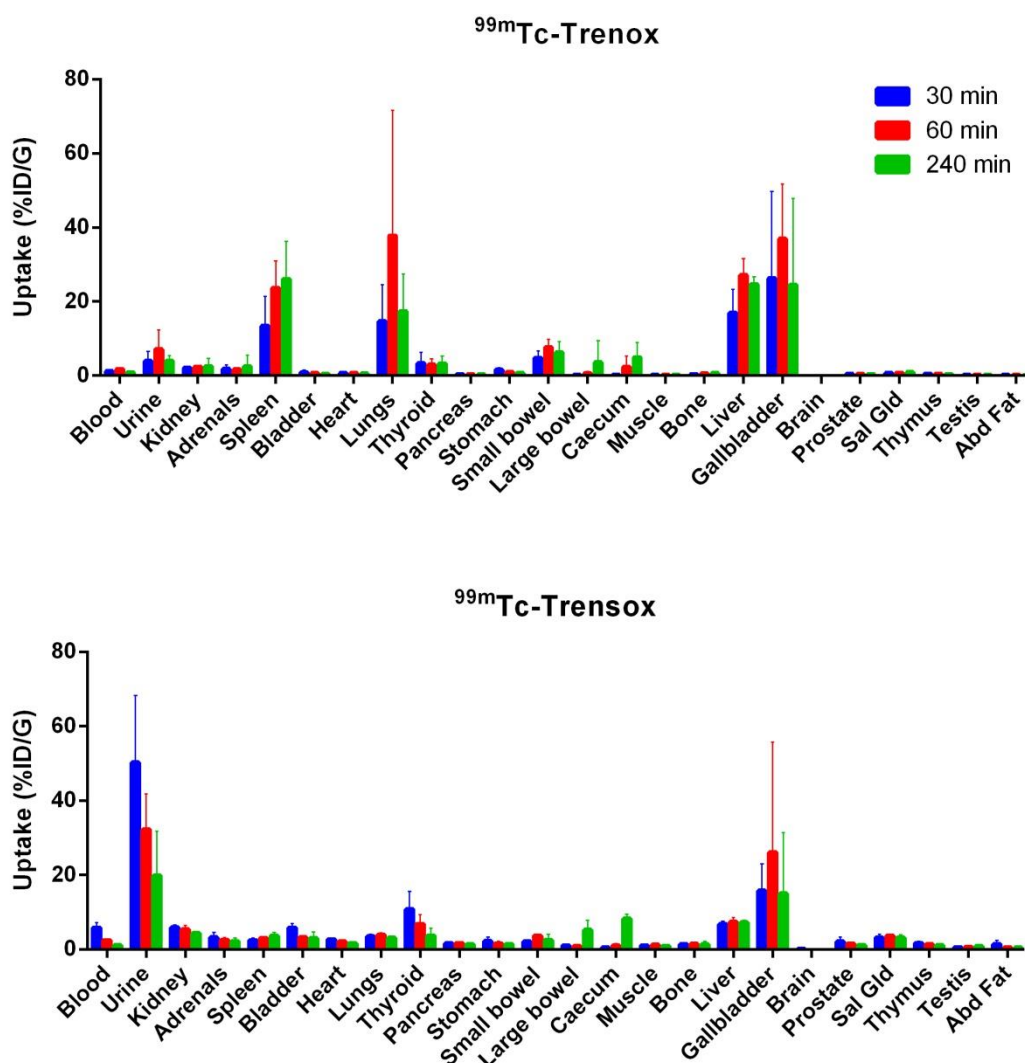


Figure 23 : Biodistribution of <sup>99m</sup>Tc-trenox (above) and <sup>99m</sup>Tc-trensox (below) in 12 mice each at 3 different times (30, 60 and 240 minutes) formulated in %ID/g mean and standard deviation

Results of biodistribution in mice for each chelate separately are shown in figure 23.

Trenox had a majority hepatic (30 %ID/g) and biliary (35 %ID/g) distribution which increased during the first hour and then decreased at 4 hours. The spleen also captured in a growing way the complex with nearly 30 %ID/g at 4 hours. There was also an important pulmonary capture, average 20 %ID/g with an important statistical standard deviation. Capture by the thyroid and stomach were minimal. Brain distribution was nearly zero while biodistribution to the brain may have been expected due to lipophilic. In fact, Log P is only one criterion to predict good brain distribution. Molecular weight should be inferior to 450 g.mol (40) to cross the blood-brain barrier which was not the case with this

chelate. An absence of functional groups that will strongly ionize at physiological pH (and thus prevent the complex from crossing this barrier) was also uncertain.

As seen before, protein binding was important in trenox case, and protein binding may play a role in the transport of the agent to the liver and into the hepatocyte (51). An ideal hepatobiliary agent for scintigraphy should have the following characteristics: rapid extraction from the plasma, high biliary concentration, little or no absorption from the intestine and minimal concentration in the urinary tract (51):  $^{99m}\text{Tc}$ -trenox fills in al.

The elimination of  $^{99m}\text{Tc}$ -trenox was mainly hepato-biliary which is consistent with the fact that this chelate was lipophilic.

For trensox, the biodistribution was mostly urinary with 50 %ID/g of the complex found in the urine after 30 minutes. This value decreased over time to arrive at 20 at 4 hours. The second organ that captures the most was the gall bladder with kinetics similar to those visible in trenox. A small hepatic as well as a decreasing thyroid capture had to be note. At 240 minutes, an intestinal distribution appeared and became superior to liver distribution. Spleen capture was minimal.

The elimination of  $^{99m}\text{Tc}$ -trensox was mainly urinary which is consistent with the fact that this chelate was hydrophilic and charged.

On figure 24, we can see the differences between the two chelates side by side. Value for thyroid was higher for trensox and this goes hand in hand with the fact that the radiochemical purity obtained with trensox was lower than that obtained with trenox. Technetium incorrectly linked can thus be released in forms of free technetium ( $\text{TcO}_4^-$ ) which was captured by the thyroid. But the fact that this biodistribution value in the thyroid for trensox decreases over time supports the fact that there was no decomplexation in mice: in 30 minutes the free technetium was completely fixed on the thyroid. It was the technetium that did not react during synthesis. From this time thyroid uptake decreases whereas it would have increased in the event of decomplexation.

There was 7 times more activity in the spleen with trenox than with trensox, this splenic capture remains unexplained but it could be colloidal technetium. Radiolabelling of 4-hydroxy-3-(2-hydroxy-3-methoxy-benzylideneamino) benzoic acid with  $^{99m}\text{Tc}$  had a similar biodistribution of  $^{99m}\text{Tc}$  trenox in liver and spleen (33).

The lack of biodistribution in the thyroid and stomach showed that there was no major decomplexing of the two complexes in the mouse, even after 4 hours. Decomplexation could occur *in vivo* and thus release technetium from the chelate. Free technetium would therefore be visible and mainly fixed on the thyroid and the stomach wall (52). Blood clearance was very rapid for both chelates with very

little activity found in the blood. In the end, the biodistribution results in mice are reassuring regarding stability in contact with human blood.

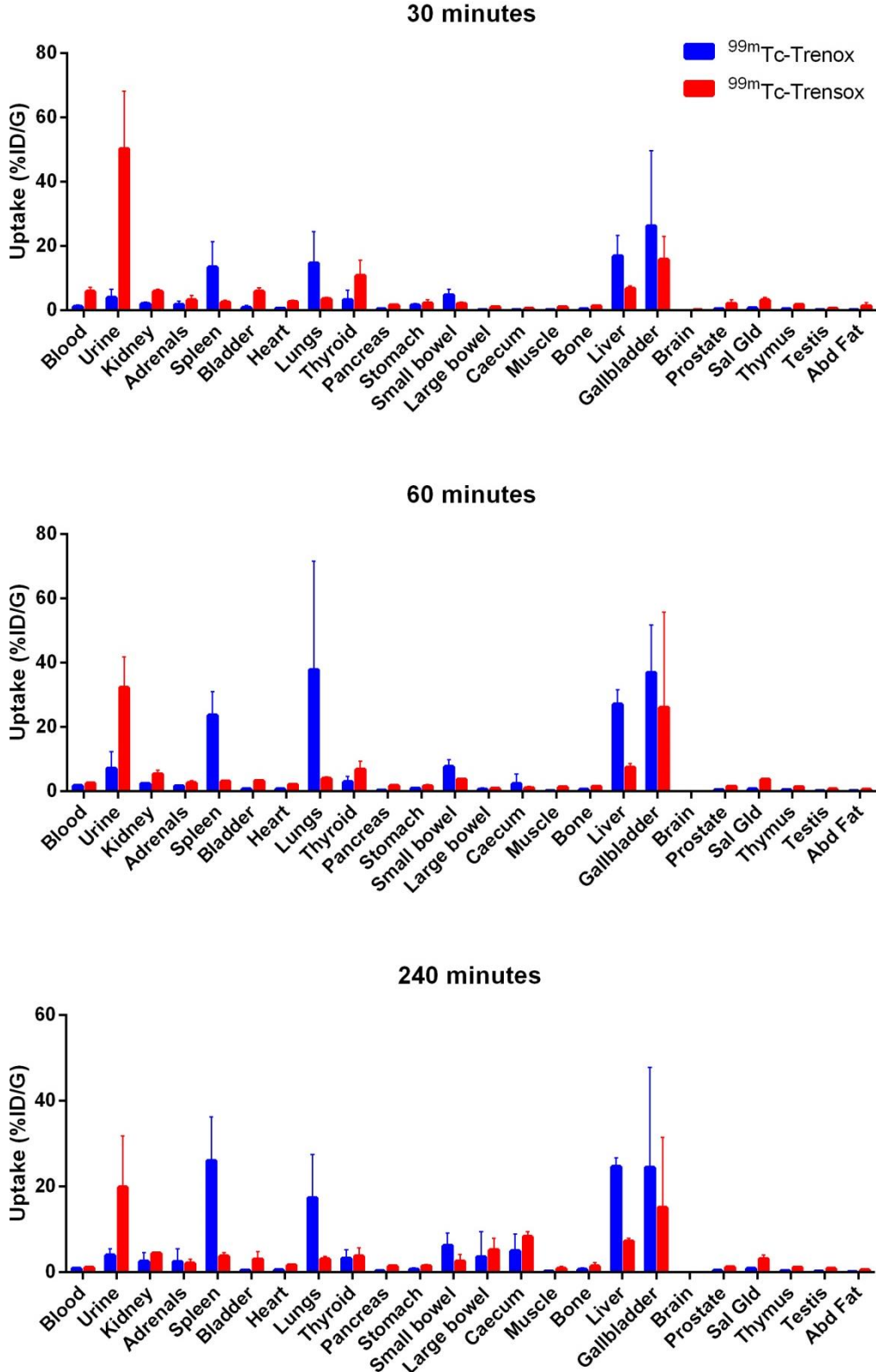


Figure 24 : Comparative biodistribution of both chelate at each times (4 mice per chelate per times) formulated in %ID/g mean and standard deviation

Presence of  $^{99m}\text{Tc}$ -trenox in the lungs, with a maximum at 60 minutes was surprising. Chart in Figure 25 represent pulmonary uptake of all mice in trenox group as function of time since radiolabeling. It shows that the longer the radiolabelling spends in the reaction vial after synthesis, the more lung uptake occurs at the level of bio-distribution in mice. This was independent of the group time which mice belong. To allow the injection of  $^{99m}\text{Tc}$ -trenox into mice, the amount of ethanol present in the mixture had to be reduced at 10% maximum. Trenox is lipophilic and sticks to the vials. Small aggregates of  $^{99m}\text{Tc}$ -trenox complex probably formed, which stuck together due to the lower level of ethanol in the reaction medium. Indeed, when we put trenox in solution we noticed that an insufficient quantity of ethanol favored the aggregation of trenox molecules together. The formation of these small aggregates was time-dependent, and increased with time from initial dilution of radiolabelling. These small aggregates after injection in the mouse will rapidly become lodged and trapped in the pulmonary vascular microcirculation. The first organ to receive the complex injected in the tail is the lungs. On SPECT/CT Figure 25, imaging of the mice in question actually shows small hyper-targeted aggregates within the lung. These aggregates were targeted and not diffuse, so they did not correspond to real pulmonary diffusion. This explained important bio-distribution in the lung which was not correlated with time shown in Figure 23. Diffusion of this chelate was therefore hepatic-biliary and splenic only, and the results in the lung were inaccurate.

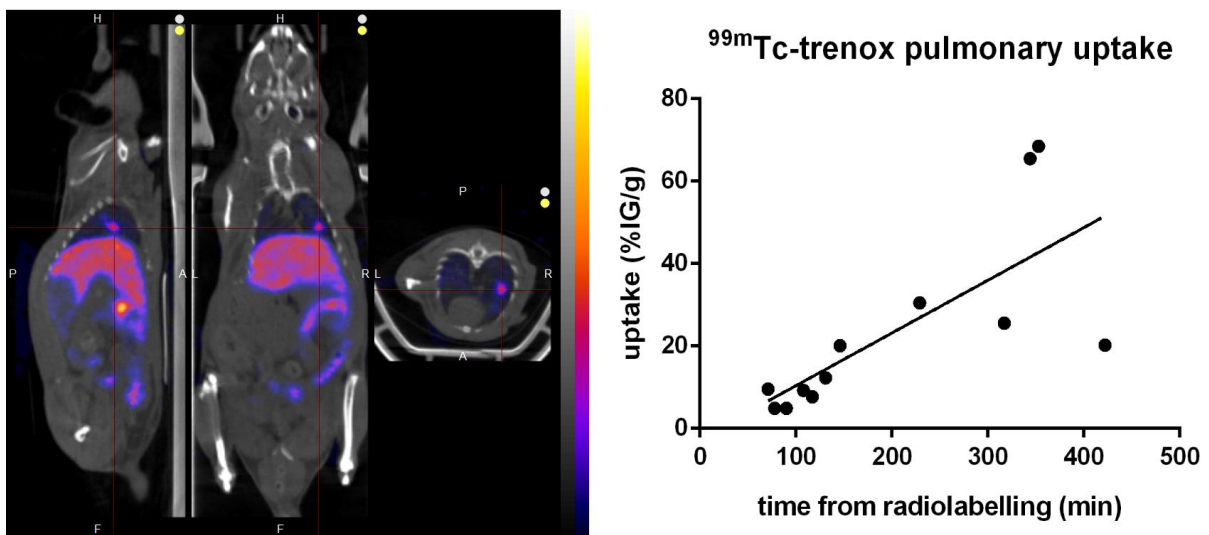


Figure 25 : Visualization of small pellet in n°2 mouse lung 240min after injection (left) and  $^{99m}\text{Tc}$ -trenox pulmonary uptake function of time from radiolabelling (right)

Images obtained with mice are expressed in %ID/g as for biodistribution, to ensure that the values obtained are comparable. For each mouse, the three straight images (Figure 26) represent the

different sections with a SPECT/CT reconstruction, while the image on the left represents the 3D reconstruction of the SPECT only.

In Figure 26 on left part, mouse number 2 of trenox group illustrated the biodistribution expressed above. At the top, at the 30-minute time, we saw mainly hepatic, intestinal and biliary uptake. The gallbladder was clearly visible and the contrast intensifies with time, in front maximum at 240 minutes. It was the small hyper intense point which was visible at the apex of the liver. The visible contents in the intestine shifted over time. Depending on the values obtained per organ after their collection, the spleen was also highly charged with 10 %ID/g at 4 hours. Unfortunately, the spleen was not easily observable on the CT and SEPCT image.

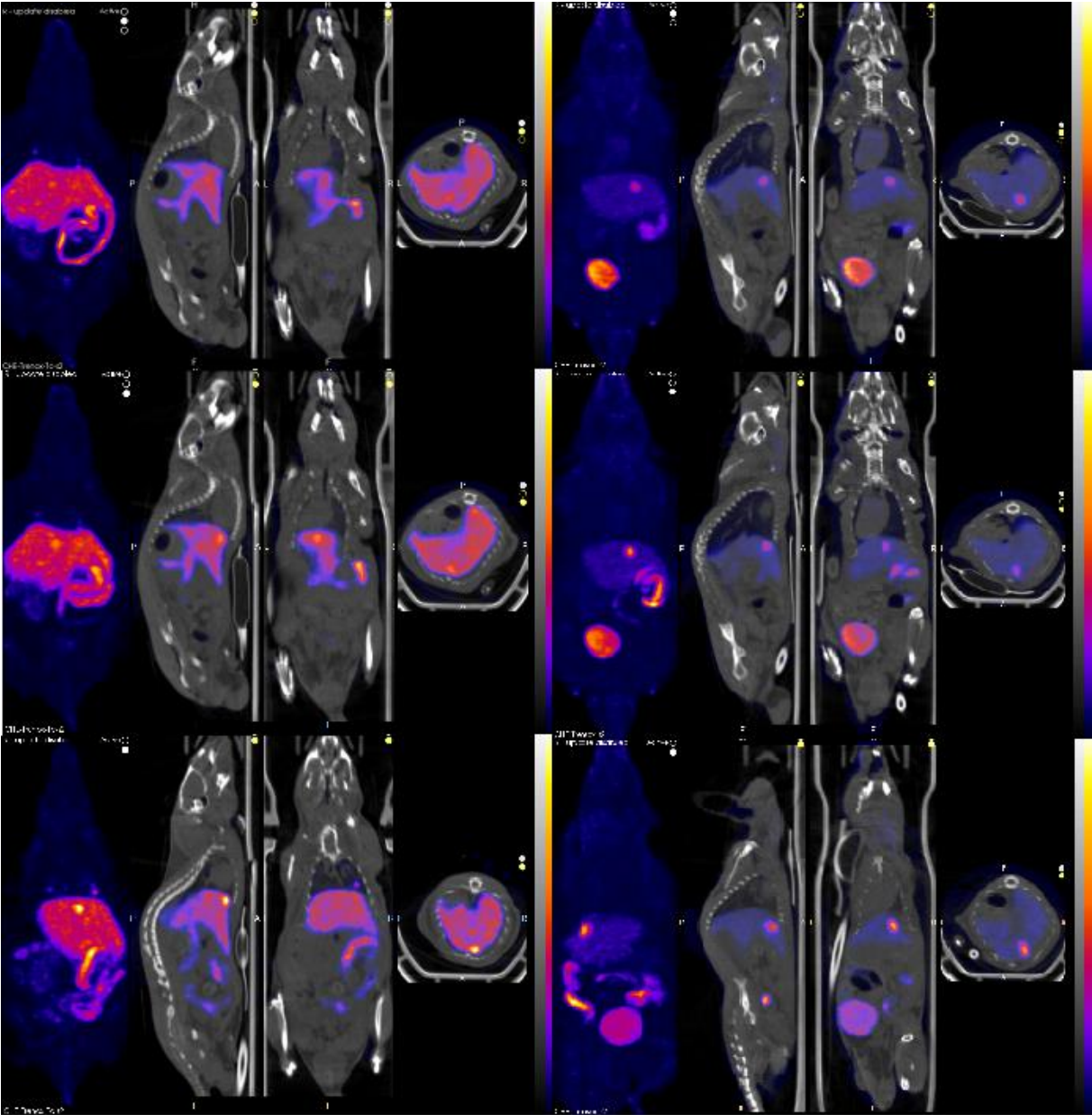


Figure 26 : Nano SPECT/CT whole body mice\_n°2, 30, 60 and 240 min after  $^{99m}\text{Tc}$ -Trenox (left) and  $^{99m}\text{Tc}$ -Trenox (right) injection



On right part on Figure 26 is imaging of the  $^{99m}\text{Tc}$ -Trensox complex in mice at different analysis times. Bladder was well recognizable and expresses itself in all imaging times. Gallbladder was visible which captures more and more as time goes by. For the rest, there was a limited hepatic and intestinal capture, notably the cecum with 8 %ID/g.

A comparison of the different results obtained is illustrated in table 12 in order to show the differences between the two chelates. The differences in the charge and log of P and consequently the different elimination of complexes are easily explained by the addition of the sulphonate groups on the trensox. Lower stability of trensox is questionable but in vivo data in mice are reassuring as to the absence of decomplexation.

Chelates	Speed of synthesis (min)	Solvent use	Mean yield (%)	Stability at 6 hours (%)	Charger	Log P	Protein binding (%)	Elimination	In vivo deterioration (in mice)
Trenox	5	Ethanol	98	96,6	Neutral	1.4 Lipophilic	74	Hepatic and gallbladder	None
Trensox	30	Water	95	87,8	Negative	-2.5 Hydrophilic	59	Urinary and gallbladder	None

Table 12 : A comparison of the results obtained with the two chelates when linked to  $^{99m}\text{Tc}$

#### 4. Conclusion

The radiolabeling of trenox and trensox with  $^{99m}\text{Tc}$  were done by a simple method (no heating and no pH adjustment necessary) and during a short time with excellent radiochemical purity (>95%)

Complexation of technetium by these two siderophors, trenox and trensox is therefore possible. The ideal conditions for radiolabeling are a chelate amount of at least 150 nmol, a reaction pH of 6, a supply of reducing agent in the form of tin pyrophosphate at 50  $\mu\text{g}$ , a temperature of 25°C and a quantity of pertechnetate derived from a sodium pertechnetate eluate as fresh as possible.

$^{99m}\text{Tc}$ -trenox is a very fast made complex under the conditions described with a high radiochemical purity of 98%. The complex is lipophilic and overall neutral. It is highly stable in vitro up to 6 hours and after injection in mice where no decomplexation is observed. The study of the biodistribution of

this complex in mice shows a predominantly biliary and hepatic fixation, followed by splenic fixation in a second stage. These characteristics confirm the lipophilicity of the complex and could be useful for the development of a radiotracer used for hepatobiliary imaging. Its main disadvantage is the need to use ethanol as a solvent, with the risk of destabilizing the complex as the percentage of ethanol decreases.

The second complex studied  $^{99m}\text{Tc}$ -trenox is a little slower to form (30 minutes) with a slightly lower radiochemical purity of 95%. This time the complex is hydrophilic, negatively charged and the solvent free of ethanol. *In vitro* stability is also lower than that of the previous complex, but we did not observe any decomplexation *in vivo* after injection in mice. Elimination of the radiotracer is mainly urinary and to a lesser extent biliary. This property, which goes hand in hand with the hydrophilicity of the complex, can be explained by the addition of sulphonate groups to the oxine of the *O*-trenox.

The first limitation of this study is that the optimal conditions for trenox synthesis were applied to trenox. The two structures being similar but different in terms of donor groups, it is possible that trenox requires other conditions to give a stable and pure complex. Secondly, the HPLC analysis of the  $^{99m}\text{Tc}$ -trenox complex was unsatisfactory and its results difficult to exploit.

The results obtained with  $\text{TcCl}_6$  must then be further investigated: determine the charge of the complex, its log P and its biodistribution in mice in order to ensure that by both methods the complexes obtained are the same. The method using HCl as a reducing agent has many advantages: superior radiochemical purity, no parasitic chemical species.

These encouraging preliminary results allow us to continue to consider the *O*-trenox and *O*-trenox/ $^{99m}\text{Tc}$  complexes as serious candidates for SPECT imaging. This study will have to be completed by an evaluation of the complexation of these siderophors with  $^{188}\text{Re}$ , an emitting isotope  $\beta^-$  having coordination chemistry very close to that of technetium-99m thus allowing an alternative theranostic use to the classical pair ( $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$ ). In the end, these two chelates could be used to complex each radioisotope of the two theranostic pairs mentioned.

## Discussion et perspectives

Trois métaux de transition sont cités dans ce travail, tout d'abord le fer, métal non radioactif bien connu, puis le technétium et particulièrement son isotope radioactif le technétium-99m qui est émetteur gamma, et enfin le rhénium (rhénium 188) qui émetteur Béta-.

Ces trois métaux de transitions présentent de proches similitudes dans leurs caractéristiques chimiques. La chimie du fer étant relativement bien connue, la chimie des deux autres métaux radioactifs est assez complexe. En effet, le nombre élevé d'état d'oxydo-réduction dans lesquels ces deux métaux existent complique la tâche de connaître précisément leur état lorsqu'ils sont inclus dans un complexe.

Nous nous basons pour ce travail sur les analogies entre le fer d'une part et les deux autres métaux radioactifs d'une autre part pour expliquer la complexation du métal par les sidérophores. La complexation fer- sidérophore est bien connue, tant de par les états d'oxydation du cœur métallique que par la coordinence ou la géométrie.

Les sidérophores, notamment le trenox et le trensox, de par leurs motifs tris 8-hydroxyquinoléine, créent des liaisons avec un atome de fer permettant la coordination dans un complexe fer-sidérophores. 6 liaisons relient l'atome de fer à la molécule de trenox ou de trensox, soit 2 liaisons par motif 8-hydroxyquinoéline (1 avec l'azote et 1 avec l'oxygène) qui est qualifié de bidentate. La géométrie est donc octaédrique et le métal central est hexacoordonné.

Ce travail démontre dans un premier temps la complexation possible d'un atome de technétium par une ou plusieurs molécules de trenox ou trensox. En effet, les deux méthodes d'analyse radio-chromatographiques utilisées confirment la création d'une entité qui possède les propriétés physiques du technétium (émission de rayonnement gamma) et les propriétés chimiques à la fois du trenox/trensox et du technétium.

Cette complexation est au final relativement facile à obtenir, avec une vitesse de formation rapide, sans apport de chaleur et sans ajustement de pH. La pureté radiochimique est très élevée, jusqu'à 98 % pour le  $^{99m}\text{Tc}$ -trenox et 95 % pour le  $^{99m}\text{Tc}$ -trensox. La liaison métal-chélate est forte et stable, car les complexes formés perdurent dans le temps, à la fois *in vitro* dans le solvant, *in vitro* au contact du sang humain et *in vivo* après injection chez la souris. Dans ces trois conditions, il n'est que peu observé de libération de technétium libre ou de technétium réduit hydrolysé qui sont les deux impuretés signifiant une sortie du technétium du chélate, ou dé-métallation.

La détermination des charges des deux complexes est une étape essentielle pour la connaissance de la manière dont se fait la coordination et la nature du cœur technétium lié par le chélate. Le complexe  $^{99m}\text{Tc}$ -trenox est neutre et le  $^{99m}\text{Tc}$ -trensox négatif. La géométrie tris-bidentate du chélate favorise la coordination hexadentate et la géométrie octaédrique du complexe  $^{99m}\text{Tc}$ -trenox, de façon identique à la géométrie obtenue avec l'atome de fer. Les liaisons se font par les 3 atomes d'azote et les 3 groupements phénolates, qui sont donc la forme déprotonée des phénols et donc chargés négativement. Il y a donc trois charges négatives apportées par les groupements phénolates qui doivent être compensées pour obtenir une charge globale neutre dans le cas du  $^{99m}\text{Tc}$ -trenox. Le cœur de technétium serait donc dans ce cas au degré d'oxydation +III.

On peut raisonnablement penser que le trensox se comporte d'une manière identique en coordination par rapport au trenox. On trouve donc un technétium central au degré d'oxydation +III, compensé par les trois phénolates également donnant une sphère de coordination neutre. Mais le trensox possède en plus trois groupements sulfonates greffés sur les noyaux aromatiques qui sont chargés négativement, confortant donc notre résultat d'un complexe  $^{99m}\text{Tc}$ -trensox négatif.

La stœchiométrie serait donc de 1 pour 1, soit une molécule de trenox complexant un atome de technétium.

Si l'on s'intéresse maintenant au complexe obtenu via  $\text{TcCl}_6^{2-}$  en utilisant l'HCl comme agent réducteur. Le technétium est au degré d'oxydation + IV ( $\text{TcCl}_6^{2-}$ ) et il se combine avec 3 oxines (ou avec 1 trenox) pour donner  $[\text{Tc}(\text{oxine})_3]^+$  (39). Dans ce cas on a un complexe chargé positivement avec les 3 oxines (ou le trenox) se lient entièrement au technétium. Expérimentalement nous devrions donc trouver un complexe chargé positivement. Ceci suppose donc que les cœurs de technétium obtenus seraient différents entre les deux méthodes de réduction décrites.

Les résultats de nos expérimentations avec  $\text{TcCl}_6^{2-}$  devront ensuite être approfondis : déterminer la charge du complexe, son log P et sa biodistribution chez la souris afin de vérifier si les complexes se comportent de la même manière que ceux obtenus en utilisant les ions stanneux. En effet, la méthode utilisant le HCl comme agent réducteur présente de nombreux avantages : une pureté radiochimique supérieure, aucune espèce chimique parasite.

Au final, le trenox et le trensox répondent aux considérations d'un bon chélate listé en introduction

- La préparation peut être faite de manière stérile comme tout MRP.
- La PRC est supérieure à 95 %
- La décomplexation est faiblement observée pour le  $^{99m}\text{Tc}$ -trensox *in vitro*, mais très peu ou pas *in vivo* chez la souris. On peut donc considérer que l'interaction entre le métal et le

chélate est forte. Concernant l'inertie vis-à-vis des molécules, *in vitro* l'étude de stabilité au contact du sang humain montre la formation d'autres espèces chimiques non identifiées. Cette observation n'est pas confirmée par l'étude de la biodistribution chez la souris où les résultats sont cohérents entre 60 et 240 minutes sans captation inhabituelle.

- La durée du marquage est de 30 minutes maximum

Néanmoins, il faut être précautionneux sur deux points :

- Une faible quantité d'éthanol dans le mélange contenant le trenox est à risque de déstabiliser le complexe ou de l'agréger. Peut s'en suivre comme montré dans l'article une captation pulmonaire parasite et non représentative. Il conviendra alors éventuellement de remonter un peu la quantité d'éthanol ou d'assurer une bonne remise en solution du mélange par agitation, avant chaque injection.
- La coordinence 6 induit des phénomènes d'isomérisation qui sont présents lors de la complexation sidérophore-fer. Ces phénomènes d'isomérisation, incluant des diastéréoisomères ne peuvent être exclus quant à la formation de nos deux complexes.

La biodistribution des deux complexes chez la souris montre que leur devenir *in vivo* reste encore désordonné. Les deux sidérophores à l'étude agissent principalement comme des « cages » qui chélatent très bien le technétium. L'ajout d'une structure vectrice sur le chélate permettra par la suite de diriger le radio-isotope vers une cible d'intérêt biologique. L'ajout de cette structure devra être faite sans modification des principales caractéristiques acquises par le couple chélate-isotope.

Ces résultats préliminaires encourageants nous permettent de continuer à considérer les complexes O-trenox et O-trenox/<sup>99m</sup>Tc comme des candidats sérieux pour l'imagerie SPECT. Cette étude devra être complétée par une évaluation de la complexation de ces sidérophores avec le <sup>188</sup>Re, un isotope émetteur β- ayant une chimie de coordination très proche de celle du technétium-99m permettant ainsi une utilisation théranostique alternative au couple classique (<sup>68</sup>Ga/<sup>177</sup>Lu). Au final, ces deux chélates pourraient être utilisés pour complexer chaque radio-isotope des deux paires théranostiques mentionnées et auraient donc une polyvalence inédite.

# Conclusion générale

THÈSE SOUTENUE PAR : Alexandre BIGUET PETIT JEAN

## TITRE :

RADIOMARQUAGE, CARACTERISATION ET BIODISTRIBUTION DE LA COMPLEXATION DU  $^{99m}\text{Tc}$  PAR DEUX CHELATES DEJA SYNTHETISES COMME SIDEROPHORES : O-TRENOX TRIS (8-HYDROXY-QUINOLEINE) ET O-TRENOSX TRIS (8-HYDROXY-5-SULFONATE-QUINOLEINE)

## CONCLUSION :

Les propriétés physiques, la grande disponibilité et le faible coût du technétium-99m en font un radio-isotope très utilisé pour l'imagerie diagnostique en médecine nucléaire. Malgré le développement récent des radio-traceurs à base d'émetteurs  $\beta^+$  (Fluor-18, Gallium-68), le technétium-99m reste un radio-isotope important pour le développement de médicaments radio pharmaceutiques utilisés en médecine nucléaire.

L'objectif de ce travail a été de valider la complexation du  $^{99m}\text{Tc}$  par deux sidérophores (O-trenox et O-trensox) développés par le Département de la Chimie Moléculaire. Ces chélates sont composés de trois parties bidentés reliées entre elles formant un chélate hexadenté complexant le technétium. Les conditions idéales de radiomarquage sont un apport en chélate d'au moins 100 nmol, un pH de réaction égal à 6, un apport de réducteur sous forme de pyrophosphate d'étain à 50  $\mu\text{g}$ , une température de 25°C et une quantité de technetium-99m issu d'un éluat de pertechnétate de sodium le plus frais possible.

Le complexe  $^{99m}\text{Tc}$ -trenox se forme très rapidement dans les conditions décrites avec une pureté radiochimique élevée de 98%. Le complexe est lipophile et globalement neutre. Très stable *in vitro* jusqu'à 6h ainsi qu'après injection chez la souris où aucune décomplexation n'est observée. L'étude de la biodistribution de ce complexe chez la souris montre une fixation majoritairement biliaire et hépatique puis splénique dans un second temps. Ces caractéristiques confirment la lipophilie du complexe et seraient utiles pour le développement d'un radiotracer nécessitant le passage de la barrière hémato-encéphalique par exemple. Son inconvénient principal est la nécessité d'utiliser l'éthanol comme solvant, avec le risque de déstabiliser le complexe à mesure que le pourcentage d'éthanol diminue.

Le deuxième complexe étudié  $^{99m}\text{Tc}$ -trensox est un peu moins rapide à se former (30 minutes) avec une pureté radiochimique légèrement moindre de 95%. Le complexe est cette fois ci hydrophile, chargé négativement et le solvant exempt d'éthanol. La stabilité *in vitro* est également inférieure à celle du précédent complexe, mais nous n'avons pas observé de décomplexation *in vivo* après injection chez la souris. L'élimination du radiotracer est majoritairement urinaire et dans une moindre mesure biliaire. Cette propriété qui va de pair avec l'hydrophilie du complexe s'explique par l'ajout de groupement sulfonate sur l'oxine du O-trensox.

Ces résultats préliminaires encourageants nous permettent de continuer d'envisager les complexes *O-trensox* et *O-trenox*/<sup>99m</sup>Tc comme des candidats sérieux en imagerie SPECT. Cette étude devra être complétée par une évaluation de la complexation de ces sidérophores avec le <sup>188</sup>Re, un isotope émetteur β- ayant une chimie de coordination très proche de celle du technetium-99m permettant ainsi une utilisation théranostique alternative à la paire classique (<sup>68</sup>Ga/<sup>177</sup>Lu).

**VU ET PERMIS D'IMPRIMER**

Grenoble, le : 10/10/20

**LE DOYEN**



**Michel SEVE**

**LE DIRECTEUR DE THESE :**

**C.H.U. GRENOBLE ALPES**

Pôle Pharmacie

**D<sup>r</sup> Julien LEENHARDT**

Pharmacien Assistant

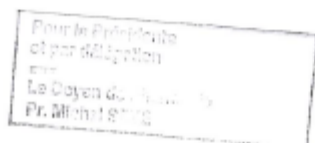
N° ordre sect. 1462138

N° RPPS : 10100840437

**LE TUTEUR UNIVERSITAIRE :**



**Michel SEVE**



## Bibliographie

1. Loi n° 92-1279 du 8 décembre 1992, modifiant le livre V du code de la santé publique, relative à la pharmacie et au médicament (J.O. du 11 décembre 1992).
2. G. Galy, M. Fraysse F. Radiopharmacie et médicaments radiopharmaceutiques. Lavoisier; 2013. 438 p.
3. Pene F, Courtine E, Cariou A, Mira J-P. Toward theragnostics. Crit Care Med. janv 2009;37(1 Suppl):S50-58.
4. Giraudet A-L. Radiothérapie interne vectorisée appliquée aux synoviosarcomes: mise en place d'une étude de phase 1. :90.
5. Dartiguenave M. Chimie de coordination et concept acide-base. In: Radiopharmaceutiques, Chimie des radiotraceurs et applications biologiques Sous la direction de Michel Vidal, Michel Comet. 1998. (Grenoble Sciences).
6. Lucchese Y. La liaison chimique dans les complexes des métaux de transition. In: Radiopharmaceutiques, Chimie des radiotraceurs et applications biologiques Sous la direction de Michel Vidal, Michel Comet. 1998. (Grenoble Sciences).
7. Nicolas Folschweiller BK Isabelle J Schalk, Hervé Celia, Mohamed A Abdallah, Franc Pattus. The pyoverdine receptor FpvA, a TonB-dependent receptor involved in iron uptake by *Pseudomonas aeruginosa* (Review). Mol Membr Biol. 1 janv 2000;17(3):123-33.
8. Schalk IJ, Hennard C, Dugave C, Poole K, Abdallah MA, Pattus F. Iron-free pyoverdine binds to its outer membrane receptor FpvA in *Pseudomonas aeruginosa*: a new mechanism for membrane iron transport. Mol Microbiol. 2001;39(2):351-61.
9. Noel S, Rivault F, J. Schalk I, L.A. Mislin G. Chimie des sidérophores : vers de nouvelles molécules pour une santé de fer ? In: Chimie des sidérophores. 2008. (Arch. Sci. Nat. Phys. Math.; vol. 46).
10. d'Hardemare A du M, Torelli S, Serratrice G, Pierre J-L. Design of Iron chelators: Syntheses and iron (III) complexing abilities of tripodal tris-bidentate ligands. Biometals. 1 août 2006;19(4):349-66.
11. Serratrice G, Boukhalfa H, Béguin C, Baret P, Caris C, Pierre J-L. O-TRENTOX, a New Tripodal Iron Chelator Based on 8-Hydroxyquinoline Subunits: Thermodynamic and Kinetic Studies. Inorg Chem. août 1997;36(18):3898-910.
12. Bardy A, Saccavini JC. Production de radionucléides - Générateurs. In: Radiopharmaceutiques, Chimie des radiotraceurs et applications biologiques Sous la direction de Michel Vidal, Michel Comet. 1998. (Grenoble Sciences).
13. de Jonge FA, Pauwels EK. Technetium, the missing element. Eur J Nucl Med. mars 1996;23(3):336-44.
14. Du Moulinet d'Hardemare A, Pasqualini R, Riche F, Vial M. Chimie du technétium <sup>99m</sup>Tc. In: Radiopharmaceutiques, Chimie des radiotraceurs et applications biologiques Sous la direction de Michel Vidal, Michel Comet. 1998. (Grenoble Sciences).



15. Vidal M. Chimie des radiopharmaceutiques. 1994. (Med Nucl).
16. Pak JK, Benny P, Spingler B, Ortner K, Alberto R. N(epsilon) functionalization of metal and organic protected L-histidine for a highly efficient, direct labeling of biomolecules with  $[Tc(OH_2)_3(CO)_3]^+$ . Chem Weinh Bergstr Ger. 9 mai 2003;9(9):2053-61.
17. Apparau' M, Drouillard' S, Mathieu' P, Moulinet AD. Mise en Evidence de la Formation de Deux Especies (Neutre et Positive) Lors de la Complexation du  $^{99m}Tc$  par les Diaminodithiols N,N'-Dialkyls. :12.
18. Sundrehagen E. Formation of  $^{99m}Tc$ -plasmin in presence of gentisic acid using  $^{99m}Tc$  pretreated with concentrated hydrochloric acid and vacuum evaporation. Int J Appl Radiat Isot. 1 févr 1982;33(2):93-7.
19. Liverant D, Wolf W. Studies on the Reduction of  $[^{99m}Tc]TcO_4$  by Hydrochloric Acid. :4.
20. Belhadj-Tahar H, Cros G, Dartiguenave M. Chimie du rhénium. In: Radiopharmaceutiques, Chimie des radiotraceurs et applications biologiques Sous la direction de Michel Vidal, Michel Comet. 1998. (Grenoble Sciences).
21. Bardy A, Saccavini JC. Production de radionucléides - Réacteurs. In: Radiopharmaceutiques, Chimie des radiotraceurs et applications biologiques Sous la direction de Michel Vidal, Michel Comet. 1998. (Grenoble Sciences).
22. Gillings N, Todde S, Behe M, Decristoforo C, Elsinga P, Ferrari V, et al. EANM guideline on the validation of analytical methods for radiopharmaceuticals. EJNMMI Radiopharm Chem. 12 févr 2020;5(1):7.
23. Carpenter AP. Radioanalytical Techniques: ITLC, TLC, Mini-Columns, and Electrophoresis. In: Wieland DM, Tobes MC, Manger TJ, éditeurs. Analytical and Chromatographic Techniques in Radiopharmaceutical Chemistry. New York, NY: Springer; 1986. p. 39-70.
24. Decristoforo C, Zolle I, Rakiás F, Imre J, Jánoki Gy, Hesslewood SR. Quality Control Methods of  $^{99m}Tc$  Pharmaceuticals. In: Zolle I, éditeur. Technetium- $^{99m}$  Pharmaceuticals. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2007. p. 123-50.
25. Vulont S, Schalk I. Rôles des sidérophores bactériens et de mammifères dans les interactions hôtes-pathogènes. médecine/sciences. août 2015;31(8-9):756-63.
26. Rakba N. Antiproliferative and apoptotic effects of O-Trensox, a new synthetic iron chelator, on differentiated human hepatoma cell lines. Carcinogenesis. 1 mai 2000;21(5):943-51.
27. Biaso F, Baret P, Pierre J-L, Serratrice G. Comparative studies on the iron chelators O-TRENSEX and TRENCAMS: selectivity of the complexation towards other biologically relevant metal ions and  $Al^{3+}$ . J Inorg Biochem. avr 2002;89(1-2):123-30.
28. Launay F, Alain V, Destandau É, Ramos N, Bardez É, Baret P, et al. From 8-hydroxy-5-sulfoquinoline to new related fluorogenic ligands for complexation of aluminium(III) and gallium(III). New J Chem. 10 oct 2001;25(10):1269-80.
29. Colas-Linhart N, Barbu M, Gougerot MA, Bok B. Five leucocyte labelling techniques: a comparative in-vitro study. Br J Haematol. janv 1983;53(1):31-41.

30. Baldas J, Bonnyman J. Preparation, HPLC studies and biological behaviour of <sup>99m</sup>Tc- and <sup>99m</sup>TcN-radiopharmaceuticals based on quinoline type ligands. *Int J Rad Appl Instrum B*. mai 1992;19(4):491-6.
31. Hnatowich DJ, Clancy B. Investigations of a new, highly negative liposome with improved biodistribution for imaging. *J Comput Assist Tomogr*. déc 1980;4(6):877.
32. Moulinet d'Hardemare A du, Gellon G, Philouze C, Serratrice G. Oxinobactin and Sulfoxinobactin, Abiotic Siderophore Analogues to Enterobactin Involving 8-Hydroxyquinoline Subunits: Thermodynamic and Structural Studies. *Inorg Chem*. 19 nov 2012;51(22):12142-51.
33. Akbar MU. Preparation, optimization and pharmacological evaluation of <sup>99m</sup>Tc- 4-hydroxy-3-(2-hydroxy-3-methoxybenzylideneamino) benzoic acid complex: as a novel potential radiopharmaceutical agent with hepatobiliary excretion. *Mol Biol Rep*. déc 2018;45(6):2717-23.
34. Am H, E S. Determination of the oxidation state of <sup>99m</sup>Tc in complexes with MDP and DTPA. *International journal of radiation applications and instrumentation. Part A, Applied radiation and isotopes*. 1987.
35. Guleria M, Das T, Vats K, Amirdhanayagam J, Mathur A, Sarma HD, et al. Preparation and evaluation of <sup>99m</sup>Tc-labeled porphyrin complexes prepared using PNP and HYNIC cores: studying the effects of core selection on pharmacokinetics and tumor uptake in a mouse model. *MedChemComm*. 22 févr 2019;10(4):606-15.
36. Belhadj-Tahar H, Darbieu MH, Campistron G, Coulais Y. Développement des radiopharmaceutiques : implication des complexes métalliques oxo et nitruro technetium-99 et rhénium à l'échelle pondérale. *Médecine Nucl*. 2004;28(3):9.
37. Banerjee SR, Foss CA, Castanares M, Mease RC, Byun Y, Fox JJ, et al. Synthesis and Evaluation of Technetium-99m- and Rhenium-Labeled Inhibitors of the Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA). *J Med Chem*. 14 août 2008;51(15):4504-17.
38. Makris G, Bandari RP, Kuchuk M, Jurisson SS, Smith CJ, Hennkens HM. Development and Preclinical Evaluation of <sup>99m</sup>Tc- and <sup>186</sup>Re-Labeled NOTA and NODAGA Bioconjugates Demonstrating Matched Pair Targeting of GRPR-Expressing Tumors. *Mol Imaging Biol*. 4 sept 2020;
39. Amartey, J.K., Wolf, W., & Liverant, J. Contributions to the chemistry and photochemistry of TcCl<sub>6</sub><sup>2-</sup>. International Atomic Energy Agency (IAEA): IAEA. 1985;
40. Waterhouse R. Determination of lipophilicity and its use as a predictor of blood-brain barrier penetration of molecular imaging agents. *Mol Imaging Biol*. déc 2003;5(6):376-89.
41. Virgone-Carlotta A, Dufour E, Bacot S, Ahmadi M, Cornou M, Moni L, et al. New diketopiperazines as vectors for peptide protection and brain delivery: Synthesis and biological evaluation: Diketopiperazines as vectors for brain delivery. *J Label Compd Radiopharm*. oct 2016;59(12):517-30.
42. Motaleb MA, Selim AA, El-Tawoosy M, Sanad MH, El-Hashash MA. Synthesis, characterization, radiolabeling and biodistribution of a novel cyclohexane dioxime derivative as a potential candidate for tumor imaging. *Int J Radiat Biol*. 16 avr 2018;94(6):590-6.

43. Motaleb MA, El-Tawoosy M, Mohamed SB, Borei IH, Ghanem HM, Massoud AA. <sup>99m</sup>Tc-labeled teicoplanin and its biological evaluation in experimental animals for detection of bacterial infection. *Radiochemistry*. sept 2014;56(5):544-9.
44. Rhodes BA. Considerations in the radiolabeling of albumin. *Semin Nucl Med*. 1 juill 1974;4(3):281-93.
45. Motaleb MA, Alabdullah ES, Zaghary WA. Synthesis, radiochemical and biological characteristics of <sup>99m</sup>Tc-8-hydroxy-7-substituted quinoline complex: a novel agent for infection imaging. *J Radioanal Nucl Chem*. janv 2011;287(1):61-7.
46. Sundrehagen E. Formation of <sup>99m</sup>Tc-immunoglobulin G complexes free from radiocolloids, quality controlled by radioimmuno-electrophoresis. *Eur J Nucl Med*. 1982;7(12):549-52.
47. El-Kawy OA, García-Horsman JA. <sup>99m</sup>Tc-roxifiban: a potential molecular imaging agent for the detection and localization of acute venous thrombosis. *J Radioanal Nucl Chem*. 1 mars 2017;311(3):1719-28.
48. Sanad MH, El-Bayoumy ASA, Ibrahim AA. Comparative biological evaluation between <sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub> and <sup>99m</sup>Tc-Sn (II) complexes of novel quinoline derivative: a promising infection radiotracer. *J Radioanal Nucl Chem*. 1 janv 2017;311(1):1-14.
49. Gharibkandi NA, Molavipordanjani S, Akbari J, Hosseini-mehr SJ. Pharmacokinetic Evaluation of <sup>99m</sup>Tc-radiolabeled Solid Lipid Nanoparticles and Chitosan Coated Solid Lipid Nanoparticles. *Curr Drug Metab*. 2019;20(13):1044-52.
50. Owunwanne A, Marinsky J, Blau M. Charge and Nature of Technetium Species Produced in the Reduction of Pertechnetate by Stannous Ion. *J Nucl Med*. 11 janv 1977;18(11):1099-105.
51. Wistow BW, Subramanian G, Heertum RLV, Henderson RW, Gagne GM, Hall RC, et al. An Evaluation of <sup>99m</sup>Tc-Labeled Hepatobiliary Agents. *J Nucl Med*. 5 janv 1977;18(5):455-61.
52. Zhang Y, Zheng Z, Yang X, Pan X, Yin L, Huang X, et al. A sensitive and rapid radiolabelling method for the *in vivo* pharmacokinetic study of lentinan. *Food Funct*. 2018;9(6):3114-25.

*Faculté de Pharmacie,  
Université Grenoble Alpes*



# Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

**D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.**

**D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.**

**De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.**

**Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».**

Alexandre BIGUET PETIT JEAN

RADIOMARQUAGE, CARACTERISATION ET BIODISTRIBUTION DE LA COMPLEXATION DU  $^{99m}\text{Tc}$  PAR DEUX CHELATES DEJA SYNTHETISES COMME SIDEROPHORES : O-TRENOX TRI (8-HYDROXY-QUINOLEINE) ET O-TRENOSX TRI (8-HYDROXY-5-SULFONATE-QUINOLEINE)

**RÉSUMÉ :** Le technétium-99m est le radio-isotope le plus utilisé pour le diagnostic en médecine nucléaire. Les sidérophores tels que le trenox et le trensox sont des agents chélatant du fer. Grâce aux groupements 8-hydroxyquinoline de ces deux sidérophores, il est possible de chélater le technétium sur le même modèle que celui du fer. Sans chauffage et sans modifier le pH, en utilisant 50  $\mu\text{g}$  de pyrophosphate comme réducteur et 150 nmol de chélate et un éluât de pertechnétate frais on obtient très facilement et rapidement le complexe  $^{99m}\text{Tc}$ -trenox avec une pureté radiochimique >98% et le complexe  $^{99m}\text{Tc}$ -trensox avec une pureté >95%. Ces deux complexes sont stables *in vitro* ainsi qu'après injection chez la souris. Le premier complexe est neutre, lipophile et candidat à l'imagerie hépatobiliaire grâce à une forte accumulation dans ces deux tissus chez la souris. Le second est chargé négativement et hydrophile grâce à l'ajout de groupement sulfonate sur le trensox d'où sa biodistribution majoritairement rénale chez la souris. Ces résultats préliminaires encourageants nous permettent de continuer d'envisager les complexes O-trensox et O-trenox/ $^{99m}\text{Tc}$  comme des candidats sérieux en imagerie TEMP. Cette étude devra être complétée par une évaluation de la complexation de ces sidérophores avec le  $^{188}\text{Re}$ , un isotope émetteur  $\beta^-$  ayant une chimie de coordination très proche de celle du technetium-99m permettant ainsi une utilisation théranostique alternative à la paire classique ( $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$ ).

**SUMMARY:** Technetium-99m is the most widely use radioisotope for diagnosis in nuclear medicine. Siderophors such as trenox and trensox are iron chelating agents. Due to the 8-hydroxyquinoline groups of these two siderophors, they could chelate technetium in similar way as iron. Without heating and without pH change, using 50  $\mu\text{g}$  of pyrophosphate as a reducing agent and 150 nmol of chelate and a fresh pertechnetate eluate, we can obtain very easily and quickly the  $^{99m}\text{Tc}$ -trenox complex with radiochemical purity >98% and the  $^{99m}\text{Tc}$ -trensox complex with purity >95%. Both complexes are stable *in vitro* as well as after injection in mice. The first complex is lipophilic and neutral while the second is hydrophilic and negatively charged. The biodistribution study in mice shows a  $^{99m}\text{Tc}$ -trenox candidate for hepatobiliary imaging with a high accumulation in both tissues due to its lipophilicity. The addition of sulfonate groups to trensox makes it more hydrophilic, hence its predominantly renal biodistribution. These encouraging preliminary results allow us to continue to consider O-trensox and O-trenox/ $^{99m}\text{Tc}$  complexes as serious candidates for SPECT imaging. This study will have to be completed by an evaluation of the complexation of these siderophors with  $^{188}\text{Re}$ , an emitting isotope  $\beta^-$  having coordination chemistry very close to that of technetium-99m thus allowing an alternative theranostic use to the classical pair ( $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$ ).

**MOTS CLÉS :** Technétium, chélate, radio-marquage, sidérophores, biodistribution, chimie

**FILIÈRE :** Pharmacie Hospitalière – Pratique et Recherche