

Chimie des traceurs pour l'imagerie médicale

Aujourd'hui, l'utilisation de macromolécules et de nanostructures suscite l'intérêt croissant de la communauté scientifique comme traceurs d'imagerie. Leur mise au point appelle l'expertise de chimistes, d'organiciens et d'inorganiciens supramoléculaires, de radiochimistes, sans oublier celle de spécialistes de la chimie des matériaux, des colloïdes et du greffage fonctionnel de surface. Tous ces chercheurs mettent en œuvre leur savoir-faire pour confectionner des structures moléculaires innovantes, certaines (radio)marquées.



Préparation de radiopharmaceutique : prélèvement et pesée d'un échantillon pour synthèse (Service hospitalier Frédéric-Joliot/SHFJ).

Radiographie conventionnelle, scanner, échographie, mais aussi imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM), imagerie optique et de fluorescence, tomographie par émission de positons (TEP) sont des techniques d'imagerie médicale. Si les premières se limitent à visualiser l'anatomie d'organes chez l'homme, les dernières permettent de comprendre le fonctionnement de ces organes et ceci sans recourir à la chirurgie ! Médecins et radiologues peuvent localiser aujourd'hui une lésion, ou une grosseur inattendue dans un tissu, avec une précision de l'ordre du millimètre. Pour le diagnostic des maladies et le suivi thérapeutique des patients, il s'agit d'une révolution. Ces avancées sont en partie dues au développement, ces dernières années, de structures moléculaires innovantes : des molécules agissant à la manière de sondes et dotées de propriétés pharmacologiques inédites et propres à chaque technique d'imagerie.

Au CEA, les chimistes concentrent leurs recherches sur les trois techniques mentionnées précédemment : l'IRM, l'imagerie optique et la TEP. Ces techniques utilisent toutes des molécules « traceur » possédant au sein de leurs structures chimiques :

- une entité dite contrastante, à l'origine de l'image (des espèces magnétiques pour l'IRM, des radioisotopes pour la TEP : fluor-18 notamment et des fluorophores pour l'imagerie de fluorescence) ;

- une entité dite de ciblage, permettant au traceur, injecté chez le patient, d'aller vers sa cible biologique ou son organe de destination.

Des marqueurs pour l'IRM et l'imagerie optique

Contrairement aux techniques d'imagerie nucléaire, ni l'une ni l'autre n'utilisent de radiations ionisantes.

• L'IRM, basée sur le phénomène de la résonance magnétique nucléaire des noyaux d'atomes d'hydrogène, donne accès à de hautes résolutions spatiales avec une pénétration illimitée dans l'organisme. Mais sa faible sensibilité impose d'injecter aux patients des agents de contraste, à base de gadolinium, pour améliorer le diagnostic – cela dans 40 % des examens cliniques. De plus, la relaxivité des composés actuels reste insuffisante pour l'imagerie moléculaire. Y pallier suppose d'obtenir des agents de contraste plus performants et des relaxivités élevées à haut champ magnétique. Des avancées importantes ont été obtenues par les chercheurs de l'Institut nanosciences et cryogénie (Inac), notamment le Service de chimie inorganique et biologique (SCIB). Leur avancée résulte d'une inclusion de gadolinium dans des systèmes macromoléculaires, ou de taille nanométrique et de la conception d'un meilleur design des molécules utilisées pour complexer ce gadolinium. L'intérêt de cette stratégie réside dans un ajustement plus pointu du nombre de molécules d'eau liées au gadolinium, de la vitesse d'échange de chacune de ces molécules d'eau avec l'eau du milieu environnant, de la vitesse de rotation brownienne du complexe et de la relaxation électronique – paramètre peu exploré. Les complexes de gadolinium ainsi obtenus, basés sur des molécules contenant des amines aromatiques associées à des groupes carboxylates, affichent une relaxivité supérieure à celle des agents de contraste actuellement utilisés dans les examens cliniques, tout en conservant une bonne stabilité physiologique. Ils ont également permis de corrélérer la structure de l'agent de contraste à sa toxicité et à certains paramètres moléculaires déterminant la relaxivité.

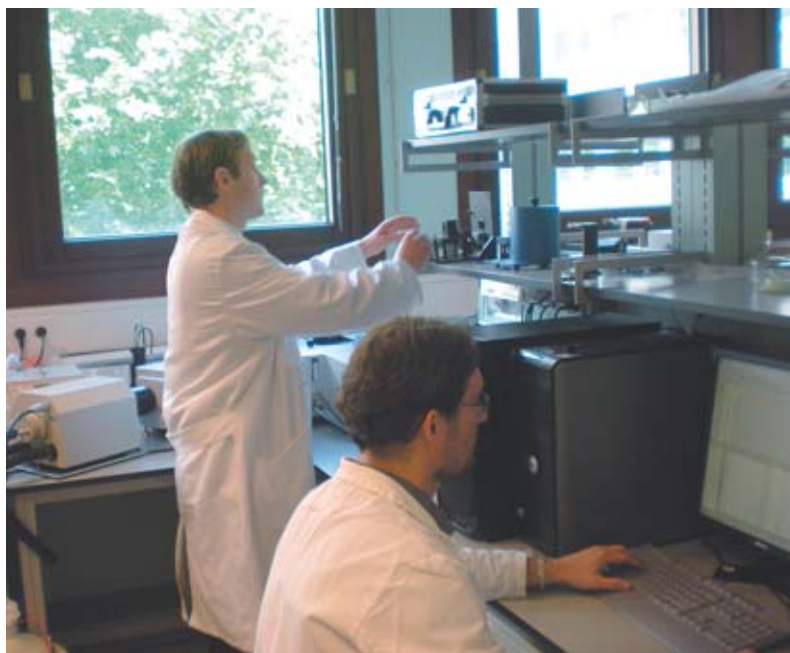
- L'imagerie optique, technique complémentaire à l'IRM, se distingue par une faible résolution spatiale mais une très bonne sensibilité. Son principe repose sur l'utilisation d'une caméra capable de suivre le devenir des marqueurs fluorescents émettant une lumière colorée (souvent dans le rayonnement visible ou infrarouge) dans les cellules. Parmi les meilleurs

marqueurs fluorescents figurent les nanocristaux **semi-conducteurs**, également appelés *quantum dots*. Les nanocristaux à base de séléniure de calcium, qui en font partie, s'utilisent déjà comme marqueurs biologiques depuis 1998. Grâce au **confinement quantique**, leur longueur d'onde d'émission s'ajuste à leur taille. En fonction du matériau utilisé, la gamme spectrale d'émission varie du **rayonnement ultraviolet** (séléniure de zinc/ZnSe) au **proche infrarouge** (**sulfure de plomb**/PbS, **alliage** indium-arsenic/InAs). Ces *quantum dots* présentent d'autres avantages : un large spectre d'absorption, des raies d'émission étroites, un rendement quantique de fluorescence élevé et une grande photo-stabilité. Seule ombre au tableau : la toxicité du cadmium. D'où l'idée des chercheurs de l'Inac, cette fois du service Structure et propriété d'architectures moléculaires (SPrAM), de développer des *quantum dots* sans cadmium pour le marquage biologique *in vitro* et *in vivo* : les nanocristaux dits « cœur/coquille » composés de **phosphore d'indium** (InP) pour le cœur et **sulfure de zinc** (ZnS) pour la coquille⁽¹⁾ ou en sulfure de cuivre et d'indium (CuInS₂/ZnS⁽²⁾) (figure 1 a).

Une seconde approche, développée par le Service des photons, atomes et molécules (Spam) de l'Institut rayonnement matière de Saclay (Iramis), concerne les nanocristaux de silicium qui offrent de multiples atouts : absence de toxicité avérée, **luminescence** dans le domaine du **rayonnement rouge/infrarouge**, synthèse en phase gazeuse par des procédés continus, extrapolable à plus grande échelle, et donc compatible avec une production commerciale. Après leur synthèse, la technique consiste à encapsuler les nanocristaux dans des particules de **silice** afin de permettre une bonne stabilité dans les milieux biologiques (figure 1 b). La surface de silice rend facilement disponible pour une **fonctionnalisation** par une fonction magnétique par exemple⁽³⁾.

La dernière approche consiste à encapsuler des fluorophores organiques, déjà approuvés pour leur usage clinique, dans les nanoparticules lipidiques (diamètre typique de 50 nm) élaborées à partir d'ingrédients pharmaceutiques : huile, lipides et excipients⁽⁴⁾ (figure 1 c). Il s'agit d'une technique issue des compétences développées par le Laboratoire d'électronique et de technologie de l'information (Leti/Département technique pour la biologie et la santé).

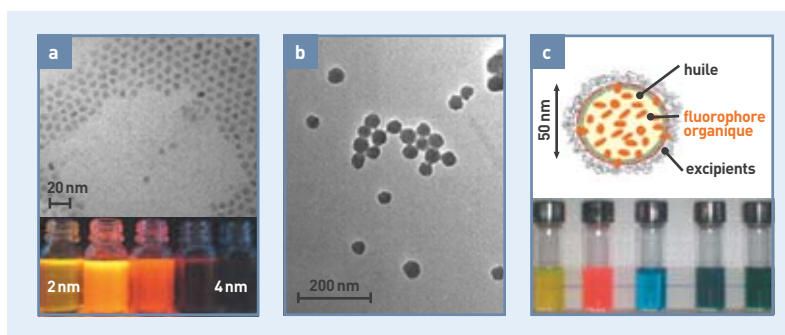
Complémentaires, l'imagerie optique et l'IRM peuvent se coupler et donc cumuler leurs avantages : haute résolution de l'IRM et haute sensibilité de l'imagerie optique. L'opération nécessite néanmoins le



D. Imbert/CEA

Mesure des propriétés optiques des composants de terbium et d'euprium.

développement de composés multimodaux spécifiques. Ainsi, dans la famille des **lanthanides**, dont le gadolinium (utilisé en IRM) fait partie, d'autres éléments chimiques, l'euprium et le terbium notamment, peuvent faire office de marqueurs optiques avec la même molécule (contenant des amines aromatiques associées à des groupes carboxylates). Comparés aux fluorophores purement organiques, ils possèdent des temps de vie longs leur permettant de s'affranchir de la fluorescence du milieu biologique. Ils présentent également une forte résistance à la **photo-décomposition** et une bonne discrimination spectrale. Des composés de lanthanides, capables d'émettre dans le rayonnement visible ou infrarouge de façon efficace, c'est-à-dire avec de très bons rendements quantiques de luminescence, ont été développés⁽⁵⁾ par les chercheurs de LRICC du SCIB⁽⁶⁾. Reste que le *design* de **molécules complexantes**, satisfaisant au cahier des charges des deux techniques, demeure un challenge. Des molécules pouvant répondre à ces critères et conduire à des sondes optiques et magnétiques ont été élaborées⁽⁷⁾ et encapsulées dans des nanosphères de silice pour construire des traceurs multimodaux⁽⁸⁾. Par ailleurs, les chercheurs de l'Inac⁽⁹⁾ développent



CEA

Figure 1. Trois approches développées pour l'élaboration de traceurs fluorescents. (a) Image de **microscope électronique à transmission MET** et série d'échantillons de nanocristaux : sulfure de cuivre et d'indium (CuInS₂)/sulfure de zinc (ZnS). (b) Exemple de nanocristaux de silicium enrobés dans une coquille de silice. (c) Exemple de nanoparticules lipidiques **dopées** par des fluorophores organiques.

(1) Li L. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 11588-11589.

(2) Li L. *et al.*, *Chem. Mater.* 2009, 21, 2422-2429.

(3) Thèse de doctorat de V. Maurice, Université de Paris XI (5 novembre 2010).

(4) Texier I. *et al.*, *J. Biomed. Opt.* 2009, 14, 054005; Goutayer M. *et al.*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2010, 75, 137-147; Delmas T. *et al.*, *Langmuir* 2011, 10.1021/la104221q.

(5) Chatterton N. *et al.*, *Angew. Chem., Intl. Ed. Engl.*, 2005, 44, 7595-7598. Nonat A., *Inorg. Chem.*, 2009, 48, 4207-4218.

(6) Laboratoire de reconnaissance ionique et chimie de coordination/Service de chimie inorganique et biologique.

(7) Nonat A., *Chem. Eur. J.*, 2006, 12, 7133-7150 et 2007, 13, 8489-8506.

(8) Samuel J., *Chem. Commun.* 2010, 2647-2649.

(9) Service de chimie inorganique et biologique (SCIB) et service Structure et propriétés d'architectures moléculaires (SPrAM).

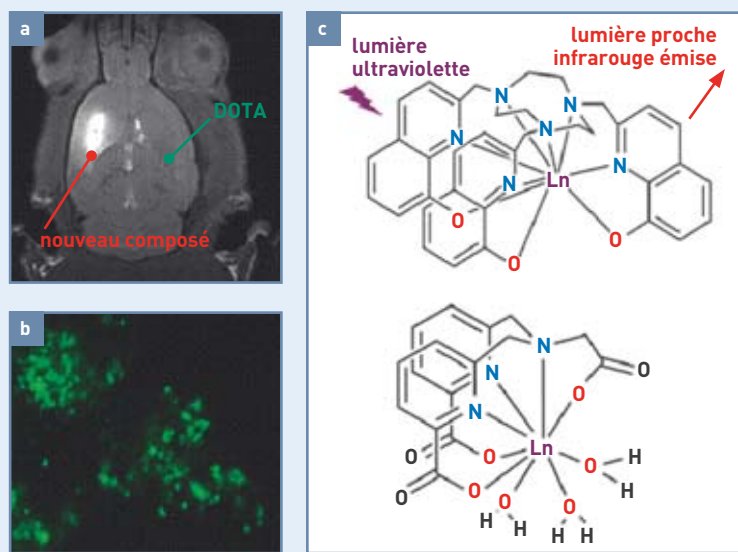


Figure 2.

(a) Image IRM de cerveau de rat 30 minutes après l'injection de l'agent de contraste ; DOTA est le nom d'un agent de contraste commercial ; (b) Image confocale (imagerie optique) de cellules avec les nouveaux marqueurs développés (CEA, DSM, Inac-SPRAM et SCIB) ; (c) Quelques exemples de nouvelles molécules conduisant à de nouveaux marqueurs magnétiques (Ln = Gd) et optiques (Ln = Tb, Yb).

des sondes bimodales en couplant des complexes de gadolinium avec des nanocristaux fluorescents de type *quantum dots*. Les premiers résultats conduisent à des agents de contraste nanométriques, à haute relaxivité, associant la modalité magnétique et fluorescente. Les deux images de la figure 2 ont été obtenues avec ces composés en collaboration avec l'équipe de Michel de Waard de l'Inserm (Grenoble Institut des neurosciences/GIN-U836). De plus, pour pénétrer dans les cellules, ou répondre par une amplification du signal IRM lors d'un processus biologique, les efforts en cours visent à coupler ces composés à des molécules d'intérêt biologique (oligonucléotides, peptides, protéines, sucres...).

Molécules marquées pour observation atraumatique

Pratiquée dans les services de médecine nucléaire, et notamment au Service hospitalier Frédéric-Joliot (SHFJ) du CEA, la tomographie par émission de positons (TEP) figure parmi les techniques d'imagerie fonctionnelle à haute résolution spatiale. Elle se spécifie par une grande sensibilité de détection permettant de quantifier *in vivo*, de manière non-invasive et donc atraumatique, des processus biologiques et physiologiques spécifiques à l'homme. Son principe repose sur la distribution (pharmacocinétique et pharmacodynamique) d'une structure moléculaire radioactive (agissant comme une sonde) permettant l'observation d'événements métaboliques et neurochimiques et donc l'obtention d'informations fonctionnelles sur l'organe visé. La TEP s'opère en trois phases :

- l'administration, généralement par voie intraveineuse, d'une molécule marquée avec un isotope radioactif (radiotracteur) ;
- la visualisation, en trois dimensions, de l'activité métabolique d'un organe, grâce aux émissions produites par les positons issus de la désintégration de l'isotope radioactif ;

• le suivi et la cartographie du cheminement de ce radiotracteur par détection externe.

Le développement de la TEP reste donc étroitement lié à la possibilité de disposer de radiotraceurs spécifiques aux cibles pharmacologiques liées aux processus pathologiques à diagnostiquer (maladies neurologiques, cancers...). Parmi ces radiotraceurs, le fluor-18, émetteur de positons à vie brève (109,8 minutes de période radioactive), fabriqué à haut rendement par réaction de transmutation nucléaire (en cyclotron), se présente comme un radio-isotope de choix pour le développement de produits radiopharmaceutiques innovants. L'oncologie clinique l'illustre en multipliant l'utilisation de l'un d'entre eux, un dérivé radiofluoré du glucose, le 2-[¹⁸F] fluoro-2-deoxy-D-glucose ([¹⁸F]FDG). De par la maturité de sa radiochimie, le fluor-18 permet également le marquage de structures moléculaires plus complexes comme les peptides, les protéines et anticorps, les oligonucléotides et leurs dérivés (Peptide Nucleic Acids/PNAs, aptamères), les polysaccharides et les nanoparticules ou nano-objets. Néanmoins, si de nombreuses macromolécules s'avèrent dotées de propriétés biologiques ou pharmacologiques exceptionnelles, voire privilégiées, pour l'imagerie moléculaire, la complexité de leurs structures chimiques et leur haut poids moléculaire exigent le développement de techniques de radiomarquage spécifiques⁽¹⁰⁾ et, en particulier, lorsque les émetteurs de positons à vie brève comme le fluor-18 sont utilisés. Le radiomarquage de ces macromolécules, par conjugaison d'un groupe prosthétique, porteur du fluor-18, fait aujourd'hui figure de paradigme. Même si le fluor moléculaire fut utilisé pour le marquage de peptides et malgré les récents développements de la chimie du fluor nucléophile pour réaliser des marquages en une étape, le marquage prosthétique des macromolécules reste aujourd'hui le plus développé et le plus utilisé. Cette stratégie peut s'apparenter à un processus séquentiel. Dans une première phase, elle consiste à préparer un réactif de faible poids moléculaire porteur du fluor-18 et dans la phase suivante à le conjuguer à la macromolécule visée chimio et régiosélectivement. Cette approche présente l'avantage de pouvoir dissocier la préparation chimique du réactif marqué au fluor-18 (multi-étapes et utilisant des réactifs et conditions rarement compatibles avec la stabilité chimique des macromolécules visées) de son couplage covalent à la macromolécule. Cette approche garantit, à la fois, la conjugaison d'un unique groupe prosthétique sur la macromolécule et le maintien de ses propriétés pharmacologiques et biologiques⁽¹¹⁾. Fort de résultats méthodologiques extrêmement prometteurs en radiofluorination hétéro-aromatique, le CEA a récemment concentré ses efforts vers la préparation et l'utilisation de nouveaux réactifs chimiosélectifs intégrant un même motif structural fluoropyridinique (Figure 3 a)⁽¹²⁾.

(10) Dollé F. *et al*, Fluorine-18 chemistry for molecular imaging with Positron Emission Tomography. In *Fluorine and Health: Molecular Imaging, Biomedical Materials and Pharmaceuticals*, Tressaud A. & Haufe G. (Eds), Elsevier, Amsterdam, 2008, Chap 1, 3-65.

(11) Kuhnast B. *et al*, *Curr. Radiopharm.* 2010, 3(3), 174-201.

(12) Dollé F., *Curr. Pharm. Design* 2005, 11(25), 3221-3235.

Une première série de composés, sélective chimiquement des fonctions contenant un atome de soufre (sulfhydryles), inclut les molécules codées $[^{18}\text{F}]\text{FPyME}$, un réactif présentant une fonction maléimide et $[^{18}\text{F}]\text{FPyBrA}$, un réactif présentant une fonction alpha-bromo-acétamide. Une deuxième série de composés, sélective chimiquement des fonctions azides et/ou alcynes, synthétisable notamment *via* un procédé simplifié (mono-étape), ouvre de nouvelles perspectives pour le marquage des macromolécules par le fluor-18 en utilisant les réactions sélectives de cycloadditions. Cette classe inclut la molécule codée $[^{18}\text{F}]\text{FPyKYNE}$. Les réactifs $[^{18}\text{F}]\text{FPyME}$ et $[^{18}\text{F}]\text{FPyBrA}$ ont, à ce jour, été utilisés avec succès pour le marquage de diverses macromolécules (figure 3b) incluant des peptides et des protéines, des séquences oligonucléotidiques (simple brin, aptamère, siRNA, *Peptide Nucleic Acids/* PNAs) et plus récemment des nano-objets. Citons notamment le marquage au fluor-18 de deux aptamères: D4-36, une macromolécule ciblant le récepteur transmembranaire à la tyrosine kinase RET, et TTA-01, une macromolécule ciblant la ténascine-C humaine. Citons aussi le marquage de nanocristaux semi-conducteurs (QD) encapsulés dans des micelles phospholipidiques fonctionnalisées.

L'imagerie moléculaire par IRM et la TEP offrent des perspectives extraordinaires à la recherche fondamentale, notamment dans le domaine de la chimie des traceurs. À ceci près que la conception d'un traceur innovant, injectable à l'homme, suppose des précautions identiques à l'introduction d'un nouveau médicament dans la pharmacopée. L'éventualité d'une toxicité du produit devra toujours être prise en compte même si, dans la plupart des cas, le patient ne connaîtra qu'une administration unique du composé dans des quantités très faibles.

Les travaux menés par les différentes équipes du CEA devraient prochainement déboucher sur de nouveaux développements dans le domaine du diagnostic (visualisation non-invasive et atraumatique d'événements biochimiques pathologiques, à l'échelle de l'organe, de la cellule, voire de la molécule) et de la prise en charge du patient (validation d'efficacité thérapeutique et aide à la chirurgie interventionnelle).

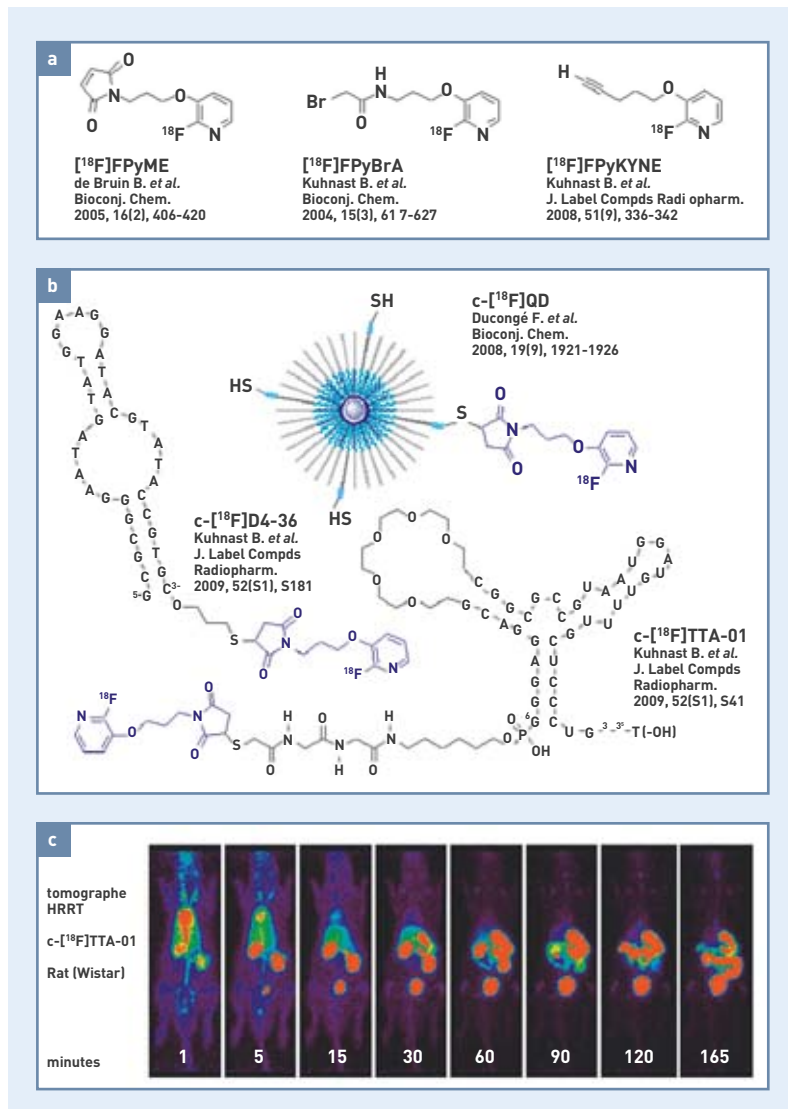


Figure 3. (a) Réactifs marqués au fluor-18 par substitution nucléophile en série hétéro-aromatique et chimiosélectivité dirigée vers des fonctions sulfhydryle, phosphorothioate et azide. (b) Application de $[^{18}\text{F}]\text{FPyME}$, un réactif radiofluoré de type maléimide, au marquage prosthétique d'aptamères ($c\text{-}[^{18}\text{F}]\text{D4-36}$ et $c\text{-}[^{18}\text{F}]\text{TTA-01}$) et de nanocristaux semi-conducteurs (QD) encapsulés dans des micelles phospholipidiques fonctionnalisées ; (c) Images corps-entier obtenues *via* le tomographe HRRT chez le rongeur après injection *in vivo* de l'aptamère $c\text{-}[^{18}\text{F}]\text{TTA-01}$.



Mise en place des produits dans la cellule blindée du robot Zymate XP (USA) réalisée au Service hospitalier Frédéric-Joliot.

> **Marinella Mazzanti et Peter Reiss**
 Institut nanosciences et cryogénie (Inac)
 Direction des sciences de la matière
 CEA Centre de Grenoble

> **Isabelle Texier et Françoise Vinet**
 Institut Leti (Laboratoire d'électronique et de technologie de l'information)
 Direction de la recherche technologique
 CEA Centre de Grenoble

> **Nathalie Herlin-Boime**
 Institut rayonnement matière de Saclay (Iramis)
 Direction des sciences de la matière
 CEA Centre de Saclay

> **Bertrand Kuhnast et Frédéric Dollé**
 Institut d'imagerie biomédicale (I2BM)
 CEA/Service hospitalier Frédéric-Joliot
 Direction des sciences du vivant
 CEA, Orsay