

# THESE

Présentée

devant l'UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE III

en vue de l'obtention du

## DOCTORAT de l'UNIVERSITE PAUL SABATIER

Spécialité : Pharmacologie

Par

**Rong Fu WANG**



### MISE AU POINT ET EVALUATION D'UN NOUVEAU RADIOLIGAND IODE SPECIFIQUE POUR L'IMAGERIE TOMOSCINTIGRAPHIQUE DES NEURORECEPTEURS AUX OPIOIDES

Présentée et soutenue publiquement le 28 Juin 1995

**JURY :**

<b>Mr. J. CROS</b>	<b>Professeur, Université Paul Sabatier</b>	<b>Président</b>
<b>Mr. R. GUIRAUD</b>	<b>Professeur, Université Paul Sabatier</b>	<b>Directeur de Thèse</b>
<b>Mr. M. BERGON</b>	<b>MCU, Université Paul Sabatier</b>	<b>Examineur</b>
<b>Mr. B. FAGRET</b>	<b>Professeur, Université Joseph Fournier</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Mr. D. GUILLOTEAU</b>	<b>Professeur, Université François Rabelais</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Mr. J. A. M. TAFANI</b>	<b>MCU, Université Paul Sabatier</b>	<b>Examineur</b>
<b>Mr. J. M. ZAJAC</b>	<b>CR 1, LPTF-CNRS</b>	<b>Examineur</b>

Ce travail s'est déroulé au sein du Laboratoire d'Imagerie Médicale Morphologique et Fonctionnelle (EA 826) et du Service Central de Médecine Nucléaire du CHU Purpan-Toulouse (France) dirigé par Monsieur le Pr. R. GUIRAUD en collaboration avec le LSPCO, Dr. L. GORRICHON (CNRS-URA 471) et l'équipe du Dr. J. M. ZAJAC (CNRS-LPTF, Pr. J. CROS).

# SOMMAIRE

I. ABREVIATIONS	6
II. ABSTRACT & RESUME	12
III. INTRODUCTION	16
IV. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	19
1. Imagerie des neurorécepteurs	19
2. Moyens d'étude des neurorécepteurs par imagerie quantitative	25
1) Techniques d'imagerie	25
- Tomographie d'émission monophotonique (TEM ou SPECT)	26
1) Principes de l'imagerie de TEM	26
2) Exemple d'étude	27
3) Radioisotopes émetteurs $\gamma$ utilisés en TEM	29
- Tomographie d'émission à positons (TEP ou PET)	30
1) Principes de l'imagerie de TEP	30
2) Exemple d'étude	32
3) Radioisotopes émetteurs $\beta^+$ utilisés en TEP	33
2) Modélisation	34
3) Radiopharmaceutiques utilisés dans l'imagerie des neurorécepteurs	37
- Critères des radioligands	37
- Radioligands spécifiques utilisés dans l'imagerie des neurorécepteurs par les techniques de TEM et de TEP	39

<b>3. Récepteurs aux opioïdes</b>	40
1) Système opioïde	40
A)-Multiplicité des récepteurs aux opioïdes	40
B)-Biologie moléculaire des récepteurs aux opioïdes	43
C)-Peptides opioïdes endogènes	45
D)-Distribution des récepteurs opioïdes	47
E)-Implications physiopathologiques des différents récepteurs aux opioïdes	48
F)-Effets pharmacologiques des opioïdes	50
2) Tolérance et dépendance aux opioïdes	53
<b>V. OBJECTIFS</b>	55
<b>VI. SYNTHÈSE D'UN NOUVEAU RADIOLIGAND IODE SPECIFIQUE ([<sup>125</sup>I]-7<math>\alpha</math>-O-iodoallyl diprénorphine)</b>	58
<b>1. Généralités</b>	58
1) Méthodes d'iodation	58
A. Méthodes classiques	59
B. Radioiododéstannylation	63
2) Molécules opioïdes radiomarquées	65
-La morphine et les dérivés morphiniques	65
-Les 6,14-endo-éthèno-orphavines	68
3) Choix de la diprénorphine	74
<b>2. Synthèse des précurseurs</b>	75
1) Synthèse du précurseur : le [E]-3-(tri-n-butylstannyl)prop-2-ène-1-ol-p-toluène sulfonate <b>6</b>	75
A) Synthèse du [E]-3-(tri-n-butylstannyl)prop-2-ène-1-ol <b>5E</b>	75
B) Synthèse du [E]-3-(tri-n-butylstannyl)prop-2-ène-1-ol-p-toluène sulfonate <b>6</b>	77

2) Synthèse de la [E]-7 $\alpha$ -O-[(3-iodoprop-2-ényl)-oxy]-diprénorphine <u>4</u>	78
A. protection du groupe hydroxyle phénolique en position 3 de la diprénorphine : synthèse de la 3-acétyldiprénorphine <u>2</u>	79
(1) Partie expérimentale	80
(2) Résultats et discussion	81
(3) Annexes	82
B. greffage du précurseur vinylstanné <u>6</u> sur la fonction alcool tertiaire en position 7 $\alpha$ de la diprénorphine <u>1</u>	84
(1) Partie expérimentale	84
(2) Résultats et discussion	86
(3) Annexes	86
<b>3. Radioiodation de la [E]-7<math>\alpha</math> -O-[[3-(tri-butylstannyl)-prop-2-ényl]oxy]-diprénorphine <u>4</u></b>	89
1) Introduction	89
2) Matériels	89
3) Méthodes	92
(1) Choix de conditions optimales d'iodation	92
(2) Protocole du marquage	93
(3) Contrôle de qualité du radiotraceur	96
4) Résultats et discussion	97
<b>4. Conclusion</b>	104
<b>VII. PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES</b>	105
<b>1. Introduction</b>	105
<b>2. Evaluation pharmacologique</b>	107
1) propriétés physicochimiques	107

A. Hydrophobicité	107
(1) Matériels et méthodes	108
(2) Résultats et discussion	108
2) Propriétés pharmacologiques	108
A. Affinité (K <sub>i</sub> , nM)	108
(1) Matériels et méthodes	108
(2) Résultats	110
(3) Discussion	111
B. Sélectivité ( $\mu, \delta, \kappa$ ) "in vivo"	112
(1) Matériels et méthodes	112
(2) Résultats	113
(3) Discussion	114
C. Activité pharmacologique	114
(1) Matériels et méthodes	114
(2) Résultats	115
(3) Discussion	116
3) Propriétés pharmacocinétiques	116
A. Biodistribution et métabolisation	116
(1) Matériels et méthodes	116
(2) Résultats	117
(3) Discussion	119
B. Passage de la BHE et liaison spécifique	119
(1) Matériels et méthodes	119
(2) Résultats	121
(3) Discussion	122
C. Etude de la dégradation "in vivo"	124
(1) Matériels et méthodes	124
(2) Résultats	125
(3) Discussion	125
<b>3. Conclusion</b>	<b>126</b>

VIII. IMAGERIE	127
1. Introduction	127
2. Autoradiographie chez la souris	128
1) Matériels et méthodes	128
(1) Etudes après injection i.v.	128
(2) Autoradiographie	129
2) Résultats	130
- Etude de liaison cérébrale	130
- Imagerie autoradiographique "ex vivo"	130
3) Discussion	132
3. Conclusion	134
IX. CONCLUSION & PERSPECTIVES	135
X. ANNEXES	140
A)-Radioligands pour l'étude des neurorécepteurs par TEP et TEM	140
B)-Structures de radioanalogues développés pour l'imagerie de neurorécepteurs par TEP et TEM	148
C)-Spectre de l'intermédiaire et du précurseur que nous avons synthétisés	153
a. Spectre de l'intermédiaire : [E]-3-(tri-n-butyl- stannyl)prop-2-ène-1-ol <b>5E</b> .	153
b. Spectre du précurseur : [E]-3-(tri-n-butyl- stannyl)prop-2-ène-1-ol-p-toluène sulfonate <b>6</b>	154
D)-Analyse élémentaire, spectre RMN <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C de la diprénorphine	156
XI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	159

**Résumé :** les techniques d'imagerie par tomographie d'émission à positon (TEP) et par tomographie d'émission monophotonique (TEM) se sont beaucoup développées depuis une dizaine d'années, en particulier pour l'étude des neurorécepteurs. Elles nécessitent l'utilisation de radiotraceurs spécifiques possédant des propriétés physicochimiques, biochimiques et pharmacologiques précisément adaptées.

En ce qui concerne les récepteurs aux opioïdes, la diprénorphine, antagoniste non sélectif de la famille des 6,14-endo-éthéno-oripavines, a été largement utilisée dans des études de TEP après marquage avec le [ $^{11}\text{C}$ ] et le [ $^{18}\text{F}$ ]. Cependant, très peu d'études par TEM ont été effectuées avec des ligands iodés. Musachio & Lever [1992] ont décrit deux dérivés iodés, 6-O- et 17-N-iodoallyl diprénorphines (6-O-IA-DPN et 17-N-IA-DPN), synthétisés à partir de la thébaïne en huit étapes et présentant une affinité pour les récepteurs aux opioïdes de 1,35 nM ( $K_i$ ) et de 23,4 nM ( $K_i$ ), c'est-à-dire plus faible pour le dérivé 6-O-IA-DPN et nettement moins bonne pour le dérivé 17-N-IA-DPN que celle de la DPN ( $K_i = 0,2$  nM). Par ailleurs, Tafani [1993] a trouvé que la méthode de marquage directe de la diprénorphine par substitution électrophile en ortho du groupe hydroxyle phénolique a conduit à une diminution importante de l'affinité d'un facteur 28.

Afin de ne pas (ou peu) modifier les caractéristiques pharmacologiques du radioligand et d'éviter une procédure d'obtention trop lourde, nous avons réalisé la synthèse d'un nouveau ligand iodé spécifique à partir de la diprénorphine comme produit de départ en utilisant les méthodes de radioiododéstannylation. Ces méthodes sont intéressantes car elles permettent d'introduire la fonction iodoallyle sur certaines positions éloignées du noyau aromatique, comme par exemple la position alcool tertiaire en  $7\alpha$ .

Le but de notre travail a donc été de développer un analogue iodé de la diprénorphine : la [E]- $7\alpha$ -O-iodoallyl diprénorphine, et d'en étudier les propriétés physicochimiques, biochimiques et pharmacologiques afin de savoir si ce nouveau radioligand pourrait permettre l'étude des neurorécepteurs aux opioïdes par les techniques de TEM.

La synthèse de la [E]- $7\alpha$ -O-iodoallyl diprénorphine a été réalisée en trois étapes : d'abord une protection régiospécifique de

l'hydroxy du phénol en position 3-C de la diprénorphine par acétylation puis une greffe du vinylstannane préalablement synthétisé en deux étapes sur l'alcool tertiaire en position 7 $\alpha$  ; la déprotection de la fonction phénolique en 3-C a lieu simultanément au cours de cette étape. Les méthodes utilisées pour la synthèse de la [E]-7 $\alpha$ -O-stannyIDPN permettent d'obtenir des rendements supérieurs à 95 %. Enfin la radioiodation de ce précurseur 7 $\alpha$ -O-stannyIDPN a été réalisée en milieu acide en utilisant l'iodogène comme agent oxydant par la méthode de iododéstannylation. L'iodation par déstannylation permet d'obtenir la [<sup>125</sup>I]-7 $\alpha$ -O-iodoallyIDPN avec une forte radioactivité spécifique (80 TBq/m mole -2200 Ci/m mole), une excellente pureté radiochimique (supérieure à 95 %) et un haut rendement de radiomarquage (90 %).

L'étude des propriétés de liaison "in vitro" de la [<sup>125</sup>I]-7 $\alpha$ -O-iodoallyIDPN pour les récepteurs aux opioïdes a été réalisée sur fractions membranaires de cerveau de souris. L'affinité de ce radioligand est excellente ( $K_i = 0,4 \pm 0,03$  nM) et comparable à celle de la diprénorphine. Les propriétés de liaison "in vivo" de ce radioligand (passage de la BHE, liaison cérébrale spécifique, biodistribution tissulaire, métabolisation et sélectivité) ont été étudiées sur cerveau de souris après injection i.v. Les résultats obtenus, 20 minutes après administration, ont montré que 0,16 % de la dose injectée de [<sup>125</sup>I]-7 $\alpha$ -O-iodoallyIDPN avait franchi la BHE et que 63 % de la liaison cérébrale du radioligand était spécifique et non sélective pour les récepteurs centraux aux opioïdes. Ce dérivé iodé conserve les propriétés pharmacologiques de type antagoniste de la diprénorphine. Des images autoradiographiques ont été réalisées, 20 minutes après injection i.v. de 200 pmoles de [<sup>125</sup>I]-7 $\alpha$ -O-iodoallyIDPN chez la souris. Ces études ont permis d'obtenir des images de la distribution spécifique de ce radioligand sur les neurorécepteurs centraux aux opioïdes de type  $\mu$ ,  $\delta$  et  $\kappa$ .

Au total, ce travail a consisté à mettre au point un procédé de synthèse et de marquage de la [<sup>125</sup>I]-7 $\alpha$ -O-iodoallyl diprénorphine, radioligand de haute affinité pour les récepteurs centraux aux opioïdes. Ce nouveau radiotraceur spécifique devrait pouvoir être utilisé chez l'homme pour étudier ces systèmes par les techniques de TEM.