

Université de Sherbrooke

**Développement d'agents  
radiopharmaceutiques pour la détermination  
des densités en récepteurs d'œstrogène (RE)  
dans les tumeurs du sein à l'aide de la  
tomographie d'émission par positrons (TEP)**

par Yann Seimbille

Département de Médecine Nucléaire & Radiobiologie

Thèse présentée à la faculté de médecine en vue de  
l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

Sherbrooke, juin 2002



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-80549-2

**Canada**

*A ma Femme, pour son amour et son soutien. Merci d'embellir ma vie un peu plus chaque jour.*

*A ma famille et les proches qui m'encouragent depuis longtemps.*

# Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma gratitude à mes deux directeurs de thèse, Dr J. E. van Lier et Dr F. Bénard pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe. Je suis très reconnaissant auprès du Dr van Lier de la confiance qu'il m'a témoignée en me recrutant, mais également au cours de mon doctorat en me laissant la liberté de m'exprimer et de m'épanouir scientifiquement. Je voudrais finalement les remercier tous les deux pour leur soutien, leur gentillesse et l'incroyable opportunité qu'ils m'ont offerte en réalisant mon doctorat dans un secteur très dynamique et plein d'avenir.

Je souhaite tout particulièrement remercier Réjean Langlois pour ses conseils, sa gentillesse et surtout pour la fidèle amitié dont il m'a fait part au cours de ces dernières années.

Je tiens à remercier également Serge Rodrigues et René Ouellette pour leurs contributions indéniables aux succès des expériences de radiochimie, Hasrat Ali pour m'avoir fait profiter de sa grande connaissance de la chimie des stéroïdes, Normand Pothier et Gaston Boulay pour les nombreuses acquisitions de résonance magnétique et de spectrométrie de masse qu'ils ont effectuées au cours de ce travail.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Jacques Rousseau, Catherine Morin, Emilie Pepin et Antonio Aliaga pour l'aide indiscutablement nécessaire qu'ils m'ont apporté pour l'obtention des données biologiques.

Je remercie également toutes les personnes qui m'ont permis, au quotidien, de connaître une aventure très enrichissante au Québec.

Enfin, je souhaite remercier les autres membres du jury, Dr J. DaSilva, Dr J. Lessard et Dr B. Paquette, pour avoir aimablement accepté d'évaluer ce travail.

# Table des matières

---

REMERCIEMENTS.....	3
TABLE DES MATIERES .....	4
LISTE DES PUBLICATIONS.....	7
ABREVIATIONS.....	8
LISTE DES FIGURES .....	10
LISTE DES TABLEAUX.....	11
RESUME.....	12
I- INTRODUCTION.....	15
1- CANCER DU SEIN .....	15
<i>1.1 Epidémiologie</i> .....	15
<i>1.2 Génétique</i> .....	16
<i>1.3 Prévention</i> .....	16
<i>1.4 Traitement et pronostic</i> .....	17
2- LIGANDS ET RECEPTEURS.....	17
<i>2.1 Œstrogènes</i> .....	17
<i>2.2 Modulateurs sélectifs des RE (MSRE)</i> .....	19
<i>2.3 Récepteurs d'œstrogène (RE)</i> .....	21
<i>2.4 Action des ligands</i> .....	23

2.4.1 Schéma général.....	23
2.4.2 Caractère moléculaire de la liaison de l'hormone au RE-LBD24	
2.4.3 Effets indirects de l'hormone .....	25
2.4.4 Différences entre œstrogène et MSRE .....	26
2.5 Carcinogénèse.....	28
2.5.1 Rôle des œstrogènes dans le cancer du sein .....	29
2.5.2 Signification pronostique du RE et des protéines œstrogéno- régulées dans les cancers du sein .....	30
3- TOMOGRAPHIE D'ÉMISSION PAR POSITRONS .....	31
3.1 Principe en TEP .....	32
3.2 Radionucléides émetteurs de positron .....	33
3.3 Le Fluor-18: Production et utilisation .....	34
3.3.1 Propriétés physico-chimiques des drogues fluorées.....	34
3.3.2 Caractéristiques du Fluor-18 .....	35
3.3.3 Méthodes de production du Fluor-18 .....	36
3.3.4 Activité spécifique .....	38
3.3.5 Chimie du [ <sup>18</sup> F]fluorure .....	39
4- RECEPTEURS ET TEP .....	41
4.1 Récepteurs de progestérone.....	42
4.2 Récepteurs d'œstrogène.....	44
4.3 Pharmacocinétique.....	44
4.2.1 Affinité de liaison.....	45
4.2.2 Protéine de transport des hormones sexuelles (SHBG).....	46
4.2.3 Métabolisme .....	49
5- AGENTS RADIOPHARMACEUTIQUES POUR L'IMAGERIE TEP DES RE .....	52
5.1 Fluorotamoxifène (FTX).....	52
5.2 βFMOX.....	53

5.3 FES.....	54
5.3.1 Radiomarquage au Fluor-18 du FES.....	54
5.3.2 Succès cliniques du FES.....	55
5.3.3 Métabolisme du FES.....	56
<b>II- ARTICLE I.....</b>	<b>58</b>
<b>III- ARTICLE II.....</b>	<b>63</b>
<b>IV- ARTICLE III.....</b>	<b>71</b>
<b>V- ARTICLE IV.....</b>	<b>83</b>
<b>VI- DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>91</b>
1- DISCUSSION.....	91
2- PERSPECTIVES.....	108
<b>VII- CONCLUSION.....</b>	<b>113</b>
<b>VIII- ANNEXES.....</b>	<b>116</b>
ANNEXE I.....	117
ANNEXE II.....	118
ANNEXE III.....	119
ANNEXE IV.....	120
ANNEXE V.....	121
ANNEXE VI.....	122
ANNEXE VII.....	123
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>124</b>

# Liste des Publications

---

Seimbille, Y.; Rousseau, J.; Bénard, F.; Ali, H.; van Lier, J.E. Synthesis of 2,16 $\alpha$ - and 4,16 $\alpha$ -[16 $\alpha$ -<sup>18</sup>F]difluoroestradiols and their 11 $\beta$ -methoxy derivatives for estrogen receptor imaging. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* 2001, 44, S348-S350.

Seimbille, Y.; Ali, H.; van Lier, J.E. Synthesis of 2,16 $\alpha$ - and 4,16 $\alpha$ -difluoroestradiols and their 11 $\beta$ -methoxy derivatives as potential estrogen receptor-binding radiopharmaceuticals. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* 2002, 5, 657-663.

Seimbille, Y.; Rousseau, J.; Bénard, F.; Morin, C.; Ali, H.; Avvakumov, G.; Hammond, G. L.; van Lier, J. E. <sup>18</sup>F-labeled difluoroestradiols: preparation and preclinical evaluation as estrogen receptor-binding radiopharmaceuticals. *Steroids.* 2002, 67, 765-775.

Seimbille, Y.; Bénard, F.; van Lier, J. E. Synthesis of 16 $\alpha$ -fluoro ICI 182,780 derivatives: powerful antiestrogens to image estrogen receptor densities in breast cancer by positron emission tomography. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* 2002, 20, 2275-2281.



# Abréviations

---

<b>AFP</b>	Alphafétoprotéine
<b>AF-1 / AF-2</b>	Fonctions d'activation de la transcription
<b>nBu<sub>4</sub>NF</b>	Fluorure de tétrabutylammonium
<b>Ch</b>	Région charnière
<b>DBD</b>	Domaine de liaison central à l'ADN
<b>EOB</b>	Fin du bombardement
<b>ERE</b>	Elément de réponse œstrogénique
<b>E<sub>1</sub></b>	Estrone
<b>E<sub>2</sub></b>	Estradiol
<b>E<sub>3</sub></b>	Estriol
<b>FDG</b>	2-Fluoro-2-déoxy-D-glucose
<b>FENP</b>	21-Fluoro-16 $\alpha$ -éthyl-19-norprogestérone
<b>FES</b>	16 $\alpha$ -Fluoroestradiol
<b>2-F-FES</b>	2,16 $\alpha$ -Difluoroestradiol
<b>4-F-FES</b>	4,16 $\alpha$ -Difluoroestradiol
<b>4-F-MFES</b>	4,16 $\alpha$ -Difluoro-11 $\beta$ -méthoxyestradiol
<b><math>\beta</math>FMOX</b>	17 $\alpha$ -Ethyanyl-16 $\beta$ -fluoro-11 $\beta$ -méthoxyestradiol
<b>FTX</b>	Fluorotamoxifène
<b>HPLC</b>	Chromatographie liquide à haute performance

<b>GC-MS</b>	Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
<b>ICI 182,780</b>	7 $\alpha$ -[9-[(4,4,5,5,5-Pentafluoropentyl)sulphinyl]nonyl]-estradiol
<b>IRM</b>	Imagerie par résonance magnétique
<b>LBD</b>	Domaine de liaison du ligand
<b>NFPT</b>	Triflate de <i>N</i> -fluoropyridinium
<b>Me<sub>4</sub>NF</b>	Fluorure de tétraméthylammonium
<b>MIVE</b>	11 $\beta$ -Méthoxy-(17 $\alpha$ ,20Z)-iodovinylestradiol
<b>MMP</b>	Métalloprotéinases de la matrice cellulaire
<b>MOM</b>	Éther méthoxyméthyle
<b>MSRE</b>	Modulateurs sélectifs des récepteurs d'œstrogène
<b>n.c.a</b>	« No-carrier-added » ou sans ajout de transporteur
<b>RBA</b>	Affinité de liaison relative
<b>RE</b>	Récepteur d'œstrogène
<b>RMN</b>	Résonance magnétique nucléaire
<b>RP</b>	Récepteur de la progestérone
<b>SEAr</b>	Substitution électrophile aromatique
<b>SHBG</b>	« Sex Hormone Binding Globulin »
<b>SPECT</b>	Tomographie par émission monophotonique
<b>TEP</b>	Tomographie d'émission par positrons
<b>% DI/g</b>	Pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu

# Liste des Figures

---

<b>Figure 1.</b> Principales formes d'œstrogène.....	18
<b>Figure 2.</b> Structures chimiques de ligands sélectifs pour le RE (MSRE).....	20
<b>Figure 3.</b> Schéma de RE $\alpha$ et RE $\beta$ .....	22
<b>Figure 4.</b> Structures chimiques des cryptands 18-crown-6 et [2,2,2]Kryptofix.....	40
<b>Figure 5.</b> Structure chimique du FENP.....	43
<b>Figure 6.</b> Hypothèse de « l'hormone libre».....	47
<b>Figure 7.</b> Phase I du métabolisme de E <sub>2</sub> .....	50
<b>Figure 8.</b> Glucuronidation. Réaction de la phase II du métabolisme de E <sub>2</sub> .....	51
<b>Figure 9.</b> Sulfatation. Réaction de la phase II du métabolisme de E <sub>2</sub> .....	51
<b>Figure 10.</b> O-Méthylation. Réaction de la phase II du métabolisme de E <sub>2</sub> .....	51
<b>Figure 11.</b> Structures chimiques du FTX.....	52
<b>Figure 12.</b> Structure chimique du $\beta$ FMOX.....	53
<b>Figure 13.</b> Radiomarquage au fluor-18 des œstrogènes à la position 16 $\alpha$ .....	54
<b>Figure 14.</b> Structure chimique du 4-F-MFES.....	103

<b>Figure 15.</b> Structure chimique du ICI 182,780.....	106
<b>Figure 16.</b> Inter-connection entre le RE et les facteurs de croissance.....	109
<b>Figure 17.</b> Structure chimique du ZD1839.....	110
<b>Figure 18.</b> Structures chimiques d'inhibiteurs de MMP.....	111
<b>Figure 19.</b> Structures chimiques des dérivés TEP du CGS 27023A.....	111

## Liste des Tableaux

---

<b>Tableau I.</b> Corrélation entre le mécanisme des MSRE et l'activité biologique.....	27
<b>Tableau II.</b> Comparaisons de modalités d'imagerie fonctionnelle et/ou biochimique....	32
<b>Tableau III.</b> Principaux radionucléides TEP.....	34
<b>Tableau IV.</b> Propriétés physico-chimiques du fluor.....	35
<b>Tableau V.</b> Méthodes de production du F-18.....	37
<b>Tableau VI.</b> Concentrations de RE et RP dans des tissus d'intérêt.....	42

# Résumé

---

Le cancer du sein est de nos jours le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les femmes dans les pays industrialisés et la mammographie représente la seule méthode disponible de dépistage systématique de cette maladie. Lorsque le diagnostic de cancer est établi, les concentrations en récepteurs d'œstrogène (RE) et en récepteurs de progestérone (RP) de la lésion détectée sont déterminées lors de l'analyse d'une biopsie puisque ces paramètres pathologiques guident le clinicien dans l'élaboration de son pronostic et la planification du traitement. Toutefois, ces mesures *in vitro* sont limitées de par leur caractère invasif, leur sensibilité, l'hétérogénéité des densités de RE dans les tumeurs primaires, et la possible discordance du statut en RE entre la tumeur primaire et les métastases. Il est donc crucial de développer une technique non-invasive qui ne serait pas affectée par l'hétérogénéité intrinsèque de la distribution des RE au sein des tumeurs et qui permette à la fois la visualisation et la quantification *in vivo* des RE de la tumeur primaire et des lésions récurrentes ou métastatiques en un seul examen. La tomographie d'émission par positrons (TEP), associée à un radioligand émetteur de positron avec des caractéristiques pharmacocinétiques et métaboliques optimales, est une technique d'imagerie nucléaire analytique très sensible et non-invasive, et offre ainsi une alternative intéressante à l'analyse *in vitro* de la biopsie. Les études expérimentales qui ont été menées avec le  $16\alpha$ -[ $^{18}\text{F}$ ]fluoroestradiol (FES), chez l'animal ou en clinique, ont en effet largement démontré la faisabilité de cette procédure. Cependant, le FES est métabolisé relativement rapidement, ce qui empêche une localisation optimale de cet agent radiopharmaceutique au niveau des sites riches en RE, et perturbe probablement l'interprétation quantitative des images obtenues lors d'un examen TEP-FES.

La fluoruration à la position 2 ou 4 sur le cycle aromatique de l'estradiol est connue pour ralentir sa dégradation métabolique en bloquant la formation des œstrogènes catéchols, alors que l'introduction d'un groupe  $11\beta$ -méthoxy améliore en général notablement la sélectivité de liaison *in vivo* et diminue les biotransformations qui interviennent sur le

cycle D. Nous avons donc envisagé de préparer une première série de composés, via l'ajout d'un substituant 2 ou 4-fluoro et/ou 11 $\beta$ -méthoxy au FES. Leurs affinités de liaison (RBA) pour le RE et différentes protéines plasmatiques, telles que l'alphafétoprotéine (AFP) et la protéine de transport des hormones stéroïdiennes sexuelles (SHBG), ont été mesurées. Des analogues radiomarqués au fluor-18 à la position 16 $\alpha$ , via une substitution nucléophile avec le [ $^{18}\text{F}$ ]F $^-$  sur des intermédiaires sulfates 16 $\beta$ ,17 $\beta$ - cycliques, ont par la suite été préparés pour l'évaluation in vivo de ces nouveaux dérivés du FES. La synthèse radiochimique est réalisée en environ deux heures avec des rendements corrigés pour la décroissance de l'ordre de 30 à 50% et l'activité spécifique des agents radiopharmaceutiques a été estimée supérieure à 3000 Ci/mmol. Parmi les six dérivés du FES testés, le 4,16 $\alpha$ -[16 $\alpha$ - $^{18}\text{F}$ ]difluoro-11 $\beta$ -méthoxyestradiol (4-F-M[ $^{18}\text{F}$ ]FES) est l'agent qui a démontré la plus forte capture utérine, ainsi que la plus forte sélectivité de liaison lors des études de biodistribution chez des rates immatures. De surcroît, Le 4-F-M[ $^{18}\text{F}$ ]FES a manifesté une bonne stabilité in vivo et une affinité de liaison pour le RE relativement bonne. Ainsi, le 4-F-M[ $^{18}\text{F}$ ]FES promet d'être un bon candidat pour l'imagerie TEP clinique des densités en RE des tumeurs du sein. Ultérieurement, cet agent pourrait également être considéré pour visualiser les sites œstrogéniques au niveau du cerveau, prédire la réponse globale à la thérapie hormonale et valider de nouvelles thérapies pour les tumeurs positives en RE chez l'animal. Cependant, il est envisageable que sa faible affinité de liaison pour la protéine SHBG puisse affecter son potentiel en tant qu'agent de diagnostic des tumeurs du sein RE(+).

Le succès de la thérapie endocrine à base de l'antioestrogène pur ICI 182,780 ou 7 $\alpha$ -[9-[(4,4,5,5,5-pentafluoropentyl)sulphinyl]nonyl]-estradiol est directement dépendant de sa capacité à se lier efficacement et sélectivement aux RE, condition également *sine qua non* pour le diagnostic des cancers du sein RE(+). Ainsi, les propriétés de localisation exceptionnelles de cet agent thérapeutique nous ont incités à développer une autre série de trois dérivés TEP radiomarqués au fluor-18 mimétiques du ICI 182,780. L'évaluation pré-clinique de ces nouveaux agents radiopharmaceutiques dédiés à la visualisation et la quantification des densités de RE dans les tumeurs du sein est actuellement en cours.

Enfin, bien que le RE soit une cible cellulaire idéale et efficace pour la prévention, le diagnostic et le traitement du cancer du sein, la découverte et la compréhension d'événements moléculaires responsables de la cancérogenèse mammaire a permis d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques et par conséquent d'entrevoir de nouvelles perspectives pour le diagnostic TEP du cancer du sein (développement d'inhibiteurs radiomarqués des récepteurs des facteurs de croissance ou des métalloprotéinases de la matrice cellulaire (MMP),...).

# I- Introduction

---

Dérivé du grec *karkinos* qui signifie crabe ou pince, le mot latin *cancer*, prend à la fin du XV<sup>e</sup> siècle la signification de tumeur maligne. Ce rapprochement est justifié par l'aspect d'une tumeur qui présente une masse centrale d'où rayonnent des veines ou des ramifications, et par son adhérence aux tissus voisins comme avec des pinces. Le cancer est un ensemble de maladies présentant des populations autonomes de cellules anormales possédant une prolifération incontrôlée tendant à envahir et à détruire les tissus sains et pouvant s'étendre à d'autres régions de l'organisme par voies sanguines ou lymphatiques.

## *1- Cancer du sein*

### **1.1 Epidémiologie**

Le cancer du sein est actuellement le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez la femme au Canada, ainsi que dans la majorité des pays développés. Il représente environ 30% des nouveaux cas de cancers chaque année, et il s'agit de la deuxième cause de mortalité par cancer chez la femme après le cancer du poumon. Ainsi, il a été estimé qu'une canadienne sur neuf sera atteinte du cancer du sein un jour ou un autre de sa vie et qu'une sur vingt cinq devrait en mourir (1). Moins de 1% des cas de cancer du sein surviennent chez les hommes. Le taux d'incidence du cancer du sein croît de façon constante depuis 1984, alors que le taux de mortalité associé demeure relativement stable, principalement grâce à l'amélioration des méthodes de dépistage et de traitement. L'âge constitue le principal facteur de risque de cette maladie; mais de nombreux autres facteurs peuvent intervenir tels que les antécédents familiaux ou personnels de cancer du sein, l'expérience antérieure de certains types de maladie bénigne du sein, les antécédents de radio-exposition du thorax, un début précoce des menstruations et/ou une ménopause



tardive. Des facteurs démographiques et environnementaux contribuent également à l'accroissement du risque de développer cette maladie : la vie en milieu urbain, une classe socio-économique supérieure et le fait d'être née en Amérique du Nord ou dans le nord de l'Europe (2). La plupart de ces facteurs de risque ne sont pas modifiables et il n'existe pas suffisamment de preuves pour encourager l'adoption de mesures de prévention primaire. Il est cependant possible que l'augmentation de la durée d'exposition aux œstrogènes endogènes ou exogènes (xénœstrogènes) soit le dénominateur commun de la grande majorité des facteurs de risque établis.

## **1.2 Génétique**

De nombreux gènes interviennent dans le développement du cancer du sein, mais la découverte récente des gènes BRCA1 et BRCA2 permet d'élucider en partie l'énigme de l'hérédité de cette maladie. Il apparaît qu'environ 1% des femmes sont porteuses du gène BRCA1 ou BRCA2 et que ces derniers seraient la cause de 3 à 8% des cancers du sein (3). Si l'un de ces gènes est détecté chez une patiente, alors son risque de contracter un cancer du sein au cours de sa vie augmente considérablement, passant de 11% jusqu'à entre 50 et 85% (4). Cependant, ces tests génétiques servent uniquement à prédire la probabilité d'un cancer du sein, et donc rien ne garantit que ce cancer se développera. De plus, le manque d'information sur l'efficacité des stratégies de prévention à l'intention des personnes à haut risque impose la nécessité d'études complémentaires avant que des tests systématiques de détection des gènes BRCA1 ou BRCA2 ne soient recommandés.

## **1.3 Prévention**

Le cancer du sein est d'origine multifactorielle, ce qui rend difficile sa prévention. Actuellement, la meilleure stratégie pour réduire la mortalité par cancer du sein consiste en une détection et une caractérisation précoce de cette maladie. La mammographie est, de nos jours, la seule méthode disponible de dépistage systématique. De nombreuses

études démontrent clairement que le dépistage mammographique, si effectué régulièrement, peut réduire d'environ 30% la mortalité par cancer du sein chez les femmes de 50 à 69 ans. La chimio-prévention par le tamoxifène ou le raloxifène a également montré des résultats encourageants, car des études cliniques ont révélé que ces produits menaient à des réductions significatives, respectivement 50 et 76%, du risque de cancer du sein chez les femmes identifiées comme à risque élevé (5, 6).

## **1.4 Traitement et pronostic**

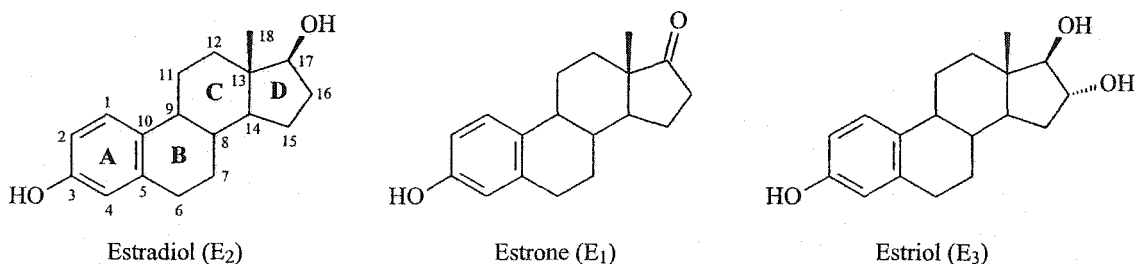
A la suite d'une mammographie ou d'un examen médical anormal, le diagnostic final est établi à l'issue de l'analyse de biopsie de la lésion détectée. Si le diagnostic de cancer est établi, alors la combinaison thérapeutique optimale doit être choisie en fonction des paramètres pathologiques déterminés. Le traitement est généralement constitué d'une chirurgie, de radiothérapie et/ou de thérapie systémique (notamment la chimiothérapie et le traitement endocrinien). Mais, ces facteurs pathologiques confèrent également au clinicien une valeur pronostic significative. Par exemple, il a été déterminé que le taux de survie des patients atteints de cancer du sein possédant des récepteurs œstrogéniques (RE+) est supérieur à celui des malades dont les cancers sont considérés comme RE(-) (7).

## ***2- Ligands et Récepteurs***

### **2.1 Œstrogènes**

Les principaux œstrogènes produits par la femme sont l'estradiol ( $17\beta$ -estradiol, E<sub>2</sub>), qui est la forme la plus active biologiquement, l'estrone (E<sub>1</sub>) et l'estriol (E<sub>3</sub>) (Figure 1). L'estradiol est le principal produit excrétoire des ovaires, et bien que l'estrone puisse également être produit par les ovaires, elle est essentiellement formée, ainsi que l'estriol, dans le foie à partir de l'estradiol où dans les tissus périphériques à partir de

l'androstènedione et les autres androgènes. Après son excrétion des ovaires, l'estradiol est relâché dans la circulation et la majorité se lie fortement à une globuline- $\alpha_2$  (SHBG «Sex Hormone Binding Globulin») et à l'albumine avec une plus faible affinité, tandis que l'autre partie reste sous forme libre. L'estradiol lié est relativement non-disponible pour la diffusion dans les cellules, donc les œstrogènes devront se dissocier des protéines plasmatiques pour devenir physiologiquement actifs, c'est à dire entrer dans la cellule et se lier à leur récepteur.



**Figure 1.** Représentation des trois principales formes d'œstrogène produites chez la femme : l'estradiol (E<sub>2</sub>), l'estrone (E<sub>1</sub>) et l'estriol (E<sub>3</sub>).

Chez les femmes pré-ménauposées, les niveaux plasmatiques d'estradiol varient considérablement pendant le cycle mensuel (de 50 pg/mL au début de la phase folliculaire jusqu'à 350-850 pg/mL au moment du pic pré-ovulatoire). Cependant, après la ménopause, les concentrations sériques d'estradiol chutent, pour devenir similaires à celles de l'homme, c'est à dire 5 à 20 pg/ml.

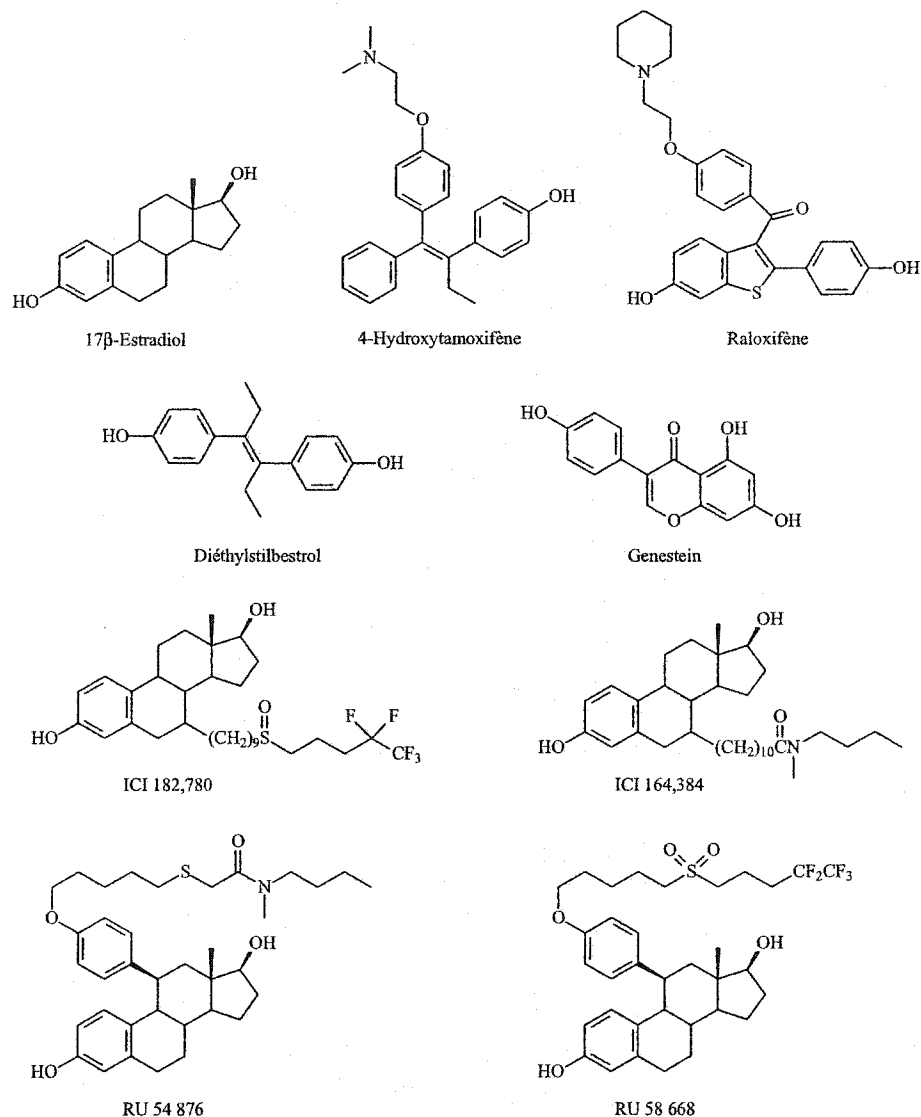
Le bénéfice le plus évident manifesté par l'œstrogène est de programmer le corps de la femme (spécialement les seins, l'utérus, et le cerveau) à la reproduction, une fonction essentielle pour le perpétuellement de la race humaine. Mais, l'hormone agit également sur d'autres organes de façon à optimiser la santé globale (8). En effet, l'œstrogène influence les centres cérébraux qui maintiennent la température corporelle et elle permet au conduit vaginal de rester épais et lubrifié. Plus important, l'œstrogène protège le cœur, principalement en limitant la formation de plaques athérosclérotiques dans les artères coronariennes (9). Les artères sont protégées en partie par la capacité de l'œstrogène à moduler la formation de cholestérol dans le foie. L'œstrogène préserve aussi les os, en

aidant à équilibrer leur création et leur dégradation (10). Enfin, l'hormone peut aider à la conservation de la mémoire et diminue le risque de la maladie d'Alzheimer.

Toutefois, un aspect plus malveillant des œstrogènes est leur aptitude à promouvoir le cancer du sein et de l'utérus, ce qui devient plus évident dans les années suivant la ménopause. L'hormone n'initie probablement pas les changements cellulaires qui résultent en ces cancers, mais elle stimule la croissance des cellules qui se dirigent vers une prolifération incontrôlée. Ainsi, les décennies d'exposition à ses propres œstrogènes augmente considérablement les risques d'une femme d'avoir une tumeur détectable; confirmant l'âge comme principal facteur de risque de ces deux cancers. Cette hypothèse a été confirmée par l'observation de populations dont le contact prolongé avec certains xénoestrogènes, composés synthétiques et mimétiques de l'œstrogène tels que des composés utilisés dans la manufacture du plastique (bisphénol A, ...) ou des pesticides, induisait une augmentation de l'incidence du cancer du sein (11, 12). A l'instar, d'autres xénoestrogènes, comme les flavonoïdes identifiés dans de nombreuses plantes, diminueraient les effets des œstrogènes et pourraient avoir une action protectrice contre le cancer du sein (13).

## **2.2 Modulateurs sélectifs des RE (MSRE)**

L'importance de  $E_2$  et du RE dans le cancer du sein ont mené au développement des antagonistes de l'œstrogène tels que le tamoxifène qui est cliniquement utilisé depuis plus de 30 ans comme thérapie endocrine pour le traitement de cette maladie (Figure 2). Toutefois, plusieurs de ces ligands synthétiques pour le RE, incluant le tamoxifène, ne se comportent pas comme des antagonistes purs de l'estradiol, et induisent des réponses œstrogéniques dans certains tissus (14). Ces observations ont mené à un raffinement de la terminologie pour ces ligands, qui sont maintenant connus comme modulateurs sélectifs des récepteurs d'œstrogène (MSRE), ce qui reflète leur capacité à interagir comme des agonistes de l'œstrogène dans certains tissus et comme des antagonistes dans d'autres.



**Figure 2.** Structures chimiques de quelques ligands sélectifs pour le RE (MSRE)

Les œstrogènes sont connus pour leur rôle primordial dans la reproduction, mais ils sont également impliqués dans la réduction de l'incidence des maladies coronariennes chez les femmes, ainsi que dans le maintien de la densité osseuse. Cependant, l'utilisation des œstrogènes chez les femmes post-ménopausées est également associée à une augmentation du risque de cancer du sein et de l'utérus (15, 16). Au contraire, les MSRE ont en général le potentiel de bénéficier des effets œstrogéniques au niveau cardiovasculaire et du squelette, sans les implications pour les glandes mammaires et l'utérus. Mais, les différents MSRE possèdent des profils agoniste/antagoniste distincts et certains

aspects de leurs activités sont indésirables. Par exemple, le tamoxifène possède une activité utérotrópique significative et son utilisation est associée à une augmentation du risque de cancer de l'utérus. Le traitement endocrinien avec le tamoxifène peut également être associé à une recrudescence tumorale et peut induire une résistance de la tumeur à la drogue (17). A l'issue de ces observations, une nouvelle génération d'antiœstrogène (RU 54,876, RU 58,668, ICI 164,384 et ICI 182,780) dépourvue d'activité agoniste œstrogénique a été développée (18-21).

Le profile agoniste/antagoniste des MSRE a encouragé leur utilisation comme agents prophylactiques contre plusieurs maladies non-relíées au cancer du sein. Le raloxifène est par exemple utilisé comme agent anti-ostéoporotique chez les femmes post-ménauposées, à cause de son aptitude à préserver la densité minérale des os sans exercer d'action utérotrópique (22, 23). L'important potentiel clinique des MSRE encourage à découvrir de nouveaux agents qui présenteraient des spécificités tissulaires de la réponse biologique différentes. Cependant, le design et l'identification de nouveaux ligands imposent de mieux comprendre les mécanismes moléculaires d'action des MSRE.

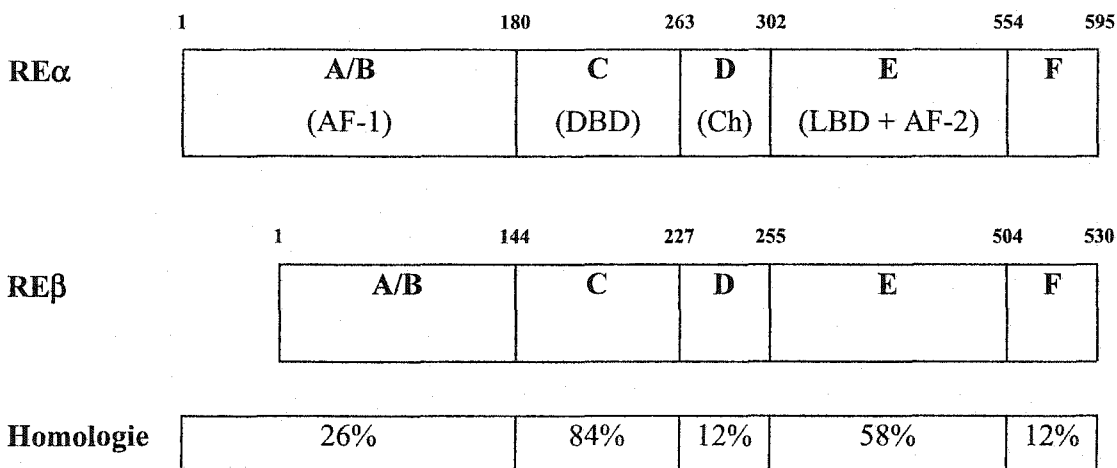
## **2.3 Récepteurs d'œstrogène (RE)**

La sensibilité hormonale de certains tissus est conférée par la présence de protéines intracellulaires, nommées récepteurs d'hormone. Ces protéines se lient avec une forte affinité avec leur stéroïde respectif, causant une rétention préférentielle du stéroïde dans le tissu sensibilisé. La manifestation de la majorité des actions des œstrogènes a lieu à travers les deux isoformes du récepteur d'œstrogène, RE $\alpha$  et RE $\beta$ , qui appartiennent à la superfamille des récepteurs hormonaux nucléaires (24, 25).

Le RE $\alpha$  est présent dans tous les tissus de l'organisme, tandis que le RE $\beta$  a été identifié jusqu'à présent dans plusieurs tissus, dont le sein, la prostate, l'utérus, les ovaires, les testicules, la vessie, les poumons, l'endothélium vasculaire, le myocarde ainsi qu'au niveau du cerveau. Les tumeurs mammaires admises comme RE positives contiennent les

deux formes du récepteur d'œstrogène. Cependant, bien que le RE $\beta$  soit exprimé dans le cancer du sein, sa fonction et son rôle potentiel dans la progression du cancer n'ont pas encore été clairement définis (26). Le RE $\alpha$ , par contre, a largement été étudié et sert de marqueur de prédiction en clinique et de cible pour le traitement.

Le RE $\alpha$  est formé d'une séquence de 595 acides aminés, contre seulement 530 pour le RE $\beta$ . Les deux isoformes sont constituées de plusieurs domaines fonctionnels spécifiques et nécessaires à leurs activités, ligands dépendantes, de régulation de la transcription génique (Figure 3, réf. 27). Ainsi, les récepteurs sont divisés en un domaine N-terminal A/B qui contient la fonction d'activation de la transcription (AF-1), un domaine de liaison central à l'ADN (DBD), une région charnière (Ch) du récepteur, un domaine (LBD) qui interagit avec l'hormone et sert de fonction d'activation de la transcription hormono-dépendante (AF-2), et un domaine F.



**Figure 3.** Schéma de RE $\alpha$  et RE $\beta$ . Les nombres, au-dessus de chaque diagramme, représentent la position de l'acide aminé des liaisons entre chaque domaine structurel des récepteurs. La région A/B possède la fonction d'activation de la transcription (AF-1). La région C contient le domaine fortement conservé de liaison à l'ADN et la région D/E interagit avec l'hormone et sert de fonction d'activation de la transcription hormono dépendante (AF-2). Le domaine C-terminal F est faiblement conservé.

Les régions DBD et LBD des deux récepteurs présentent une homologie de 84 et 58% respectivement, alors que les autres domaines ne sont pas bien conservés. Les domaines AF-1 des deux isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  sont distincts, ce qui serait probablement à la base de plusieurs différences fonctionnelles des deux sous-types de récepteurs. De plus, il apparaît que le AF-2 du RE $\beta$ , contrairement à son homologue sur le RE $\alpha$ , n'opère pas systématiquement en synergie avec le AF-1.

## 2.4 Action des ligands

### 2.4.1 Schéma général

Les récepteurs œstrogéniques sont situés dans le noyau, liés aux protéines de choc thermique (essentiellement Hsp90) qui les stabilisent. La liaison de l'hormone à son récepteur, via le domaine LBD du RE, altère sa conformation et le libère des protéines stabilisatrices (Annexe I). Le complexe récepteur-hormone forme ensuite des homodimères qui se lient à une séquence spécifique de nucléotides appelée élément de réponse œstrogénique (ERE) dans les promoteurs de plusieurs gènes et régule ainsi leur transcription (28). L'interaction d'un dimère de récepteur avec le ERE implique aussi quelques protéines nucléaires, telles que les composantes de la machine de transcription et des protéines modulatrices, appelées les corégulateurs (29, 30). Les effets génomiques manifestés par l'hormone sont principalement dus aux protéines synthétisées en réponse à l'ARN transcrit par les gènes activés.

L'identification récente des corégulateurs de transcription qui peuvent être associés avec les récepteurs hormonaux nucléaires et augmentent ou répriment leurs activités, fut une contribution majeure à la compréhension des mécanismes d'action du récepteur d'œstrogène. Cependant, les mécanismes moléculaires, par lesquels ces coactivateurs/corépresseurs agissent, restent encore méconnus. Les concentrations relatives et le type des récepteurs, des corégulateurs et des facteurs de transcription conféreront à la cellule sa spécificité vis à vis de l'action de l'hormone (31).



## 2.4.2 Caractère moléculaire de la liaison de l'hormone au RE-LBD

La liaison de l'hormone au domaine de liaison LBD du RE est une étape essentielle dans la manifestation des effets physiologiques induits par l'hormone, car elle initie l'activation du récepteur qui conduit à une série d'événements moléculaires culminant en l'activation ou la répression des gènes cibles. L'architecture générale du RE-LBD est très similaire à celle observée pour les autres LBD des récepteurs nucléaires, et consiste en trois couches d'hélices (hélices H1-H12) antiparallèles (Annexe II, réf. 32, 33). La couche centrale (H5/6, H9 et H10) est prise en sandwich par les deux autres couches d'hélices (H1-4 et H7, H8, H11) (34). La reconnaissance de l'hormone par son récepteur est accomplie à travers la combinaison de liaisons hydrogène spécifiques et la complémentarité de la cavité de liaison avec le caractère non-polaire du ligand. L'estradiol se lie diagonalement à travers la cavité, entre H11, H3 et H6 et adopte une conformation de basse énergie, où le cycle B du stéroïde est dans une conformation déformée de demi-chaise-7 $\alpha$ ,8 $\beta$  (35, 36, 37). L'hydroxyle phénolique (O3) du cycle A de E<sub>2</sub> se niche entre H3 et H6 et crée des liaisons hydrogène directes avec le carboxylate de l'acide glutamique 353, le groupe guanidinium de l'arginine 394, et avec une molécule d'eau (Annexe III, réf. 34). Par contre, le 17 $\beta$ -hydroxyle du cycle D (O17) interagit selon une seule liaison hydrogène avec l'histidine 524 dans H11. Le reste de la molécule participe aussi à la liaison, selon des contacts hydrophobiques qui sont concentrés sur les cycles A, D et l'interface A/B. Le cycle A, ainsi que l'interface plannaire A/B, sont emprisonnés par les chaînes latérales de Ala 350 et Leu 387 sur la face  $\beta$ - et de Phe 404 sur la face  $\alpha$ -. De l'autre côté de la cavité de liaison, des contacts non-polaires ont lieu entre le cycle D et les acides aminés suivants: Ile 424, Gly 521 et Leu 525. Cette combinaison d'interactions spécifiques polaires et non-polaires explique la capacité du RE à reconnaître et à se lier sélectivement à E<sub>2</sub> selon une affinité subnanomolaire parmi les nombreux stéroïdes endogènes présents.

Cependant, le RE est unique parmi les récepteurs stéroïdaux de par sa capacité à se lier à une grande variété de composés non-stéroïdaux (35). Mais, la disposition autour du cycle A impose nécessairement aux ligands de contenir un cycle aromatique, alors que le reste

de la poche de liaison tolère de nombreux groupes hydrophobes différents. Cette promiscuité est attribuée à la taille de la cavité, qui a un volume accessible ( $450 \text{ \AA}^3$ ) presque deux fois supérieur au volume moléculaire de  $E_2$  ( $245 \text{ \AA}^3$ ). La longueur et la largeur du squelette de  $E_2$  correspondent parfaitement au récepteur, mais des grandes cavités restent inoccupées sur la face  $\alpha$ - du cycle B et la face  $\beta$ - du cycle C.

### ***2.4.3 Effets indirects de l'hormone***

Outre, les effets génomiques manifestés par la liaison de l'homodimère hormone-RE à l'ERE, il a récemment été démontré que le  $RE\alpha$  et le  $RE\beta$  pouvaient stimuler indirectement l'expression génique en se liant à d'autres facteurs de transcription, tels que AP-1 et Sp1; augmentant de cette façon considérablement le répertoire potentiel de gènes régulés par ces récepteurs (38, 39). Ces effets génomiques indirects se concrétisent par des effets autocrines et paracrines des facteurs de croissance, des lipides, des glycolipides ou des cytokines produits par les cellules avoisinantes et induits par l'action de l'hormone.

Le RE est également capable de réprimer la transcription réalisée par d'autres facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B, C/EBP et GATA-1, ajoutant des voies mécanistiques possibles par lesquelles le RE fonctionne biologiquement. Cette répression est due à l'interaction du DBD du  $RE\alpha$  avec ces facteurs de transcription et donc n'implique pas de liaison directe du  $RE\alpha$  à l'ERE. Toutefois, de plus amples études sont nécessaires afin de déterminer comment ces actions du récepteur contribuent à la réponse physiologique de l'hormone. Enfin, certains effets physiologiques rapides induits par l'œstrogène sont non-génomiques, comme des altérations de la perméabilité ionique de la membrane cellulaire, l'augmentation du flux sanguin de l'utérus, ou l'activation de protéines kinases mitogéniques (MAP) qui sont exprimées dans plusieurs tissus tels que les os, le système cardio-vasculaire et le cerveau. Ces réponses semblent provenir de récepteurs membranaires distincts des récepteurs intracellulaires ou par des effets enzymatiques du complexe classique RE-œstrogène.

#### ***2.4.4 Différences entre œstrogène et MSRE***

Les MSRE, comme les œstrogènes, se lient au RE, le dissocient des protéines de choc thermique et induisent la dimérisation et la liaison à l'ERE sur les gènes spécifiques. Mais, une des observations les plus importantes pour la compréhension de la pharmacologie du RE fut la démonstration que la structure du complexe RE-ligand est dépendante de la nature du ligand lié (40). En effet, chaque ligand produit des différences conformationnelles distinctes dans le domaine LBD du récepteur (41). Ainsi, il a été démontré que la liaison du tamoxifène ou du raloxifène (cf figure 2) au RE-LBD déplace la partie la plus C-terminale du domaine LBD, c'est à dire l'hélice H12, par rapport à la structure établie pour E<sub>2</sub>-LBD (Annexe IV, réf. 34). Or, il a été identifié que H12 est essentielle à la fonction d'activation transcriptionnelle AF-2 du récepteur en vertu de son rôle dans la régulation de la liaison des coactivateurs avec le RE lié à un ligand (42). Il a donc été suggéré, à partir de ces observations, que l'inhibition de l'activité AF-2 par le tamoxifène et le raloxifène provient de la capacité de la cellule à différencier ces structures distinctes du LBD lié, et que par conséquent ces différences conformationnelles seraient en partie responsables du profil biologique unique exercé par chaque MSRE.

L'activation des séquences AF-1 et AF-2 est cependant fortement dépendante du promoteur et du contexte cellulaire, c'est à dire que dans certaines cellules une seule séquence d'activation est suffisante pour une efficacité maximale du RE alors que dans d'autres les deux sont nécessaires. Par conséquent, l'action agoniste du tamoxifène au niveau des os et de l'utérus semble se concrétiser par la stimulation de la transcription via le AF-1 dans certains contextes cellulaires et donc provient essentiellement du mécanisme conventionnel d'interaction du complexe récepteur-ligand avec l'élément de réponse ERE de l'ADN (Tableau I, réf. 43, 31).

Par contre, le raloxifène inhibe les deux fonctions d'activation de la transcription AF-1 et AF-2 du récepteur, et donc son action prophylactique au niveau des os s'effectue probablement par des voies alternatives d'interaction du RE, telles que celles avec les

facteurs de transcription AP-1 ou Sp1, ou par les processus non-génomiques (41). L'inhibition concomitante de l'activité AF-1 par le raloxifène ne peut malheureusement pas être expliquée par les différences structurelles engendrées par ce ligand sur le RE-LBD, puisque le domaine N-terminal AF-1 est relativement éloigné du domaine de liaison au ligand.

**Tableau I.** Corrélation entre le mécanisme d'action des ligands du RE et l'activité biologique

	Estradiol	Tamoxifène	Raloxifène	ICI 182,780
Interaction avec le RE-LBD	+	+	+	+
Dimérisation du récepteur	+	+	+	±
Interaction du RE avec l'ADN	+	+	+	±
Activité agoniste AF-1	+	+	-	-
Activité agoniste AF-2	+	-	-	-

Il a été identifié que ces deux MSRE stimulent à la fois l'activité du RE $\alpha$  et du RE $\beta$  vis à vis des sites AP-1 dans les gènes cibles, tandis que E<sub>2</sub> lié à RE $\beta$  inhibe la transcription génique AP-1 mais la stimule avec RE $\alpha$  (44). Or, il s'avère que parmi les gènes régulés par l'AP-1, certains sont impliqués dans la prolifération cellulaire et l'apoptose, ce qui justifie l'hypothèse qu'une augmentation de l'activation de AP-1 ou de l'expression du RE $\beta$  puisse contribuer au mécanisme, souvent observé, de résistance des tumeurs du sein aux thérapies endocrines (45). La réalisation qu'un ligand puisse exercer des effets biologiques à travers l'un et/ou l'autre des isoformes du RE augmente considérablement la complexité de la biologie des MSRE, et il est probable que la distribution tissulaire des deux sous-types de RE et de leurs nombreux corégulateurs contribue à la sélectivité d'action des MSRE. Un modèle simple de l'action des corégulateurs propose que les récepteurs inoccupés sont négativement régulés par les corépresseurs jusqu'à l'addition du ligand apparenté qui induit le relâchement des corépresseurs et le recrutement ultérieur des coactivateurs. Or, dans le cas des RE, les corépresseurs apparaissent se lier aux récepteurs seulement en présence de MSRE, alors que le recrutement de coactivateurs est favorisé par les liaisons de E<sub>2</sub> à son récepteur. Il a été observé que la surexpression de

corépresseurs ou l'inhibition de coactivateurs peut bloquer l'activité agonistique partielle du tamoxifène lié au RE $\alpha$  (46, 47). Ces études ont mené à l'hypothèse que l'altération au cours du temps de l'expression des coactivateurs et corépresseurs pourrait contribuer au phénomène de résistance endocrine. Ainsi, la résistance au tamoxifène des cancers du sein RE(+) pourrait être associée à une réduction des concentrations en protéines corépressives dans les cellules tumorales du tissu mammaire qui ont été chroniquement exposées au tamoxifène (47, 48).

Le ICI 164,384 et le ICI 182,780 sont des antiœstrogènes stéroïdaux purs, c'est à dire qu'ils sont totalement dépourvus d'effets agonistes et leur mécanisme d'action est fondamentalement différent de celui des autres MSRE (Figure 2). Pharmacologiquement, ces composés ont la particularité d'empêcher la dimérisation du récepteur mais aussi d'induire une rapide dégradation du RE et ultérieurement son élimination de la cellule (49, 50). De par la perte cellulaire du RE, ils agissent comme de puissants antiœstrogènes dans tous les tissus incluant le sein, l'utérus et probablement les os.

A l'aube de ces révélations sur la multitude des voies mécanistiques moléculaires potentielles et responsables de la réponse biologique des œstrogènes et/ou des MSRE, il apparaît que la distinction entre le caractère agoniste ou antagoniste du ligand après sa liaison avec le RE, dépende à la fois de la nature du ligand (conformation du RE-LBD) mais aussi du contexte cellulaire, c'est dire la concentration et le type des récepteurs (RE $\alpha$  et RE $\beta$ ), des corégulateurs et des facteurs de transcription (ERE, AP-1, Sp1, ...).

## 2.5 Carcinogénèse

Les causes exactes et les événements moléculaires responsables de la cancérogenèse mammaire restent inconnus, mais plusieurs facteurs de risque sont maintenant établis. L'instabilité génétique affectant les proto-oncogènes ou les gènes suppresseurs de tumeur, des facteurs héréditaires, et des facteurs hormonaux sont impliqués dans la transformation maligne des cellules mammaires. Les études de

carcinogénèse induites chez l'animal et les études épidémiologiques développées chez les malades ont démontré que les hormones ovariennes et en particulier les œstrogènes jouent un rôle de « promoteur » de la cancérogenèse.

### ***2.5.1 Rôle des œstrogènes dans le cancer du sein***

Les études expérimentales chez l'animal ou cliniques menées dès le début du siècle ont démontré que les œstrogènes stimulent la croissance des tumeurs mammaires *in vivo*. Le mécanisme de cette prolifération a ensuite été identifié par la découverte des récepteurs d'œstrogène (RE) dans les cancers du sein, puis par la mise en évidence d'un effet mitotique direct des œstrogènes dans les lignées cellulaires établies à partir de métastases de cancer du sein (51). Mais, une compréhension plus approfondie de la pharmacologie du RE révèle que la contribution des œstrogènes dans la cancérogenèse mammaire est principalement associée au contrôle qu'ils exercent sur la croissance et l'invasivité des cellules du cancer du sein, c'est à dire par le biais de leur activité de régulation de la transcription de certains gènes codant pour des récepteurs hormonaux (récepteurs de la progestérone ou de l'acide rétinoïque), des facteurs de croissance (TGF $\alpha$ , R-IGF1, c-erb B2) ou des protéases reliées au caractère invasif et métastatique (cathepsine D, urokinase, ...). Maintenant, la compréhension de l'implication des œstrogènes dans la cancérogenèse mammaire consiste essentiellement à définir la fonction et la signification pronostique ou prédictive de ces protéines induites par les œstrogènes.

Un autre mécanisme impliquant les œstrogènes dans la carcinogénèse du sein a été identifié et fait intervenir des interactions « protéine-protéine » plus ou moins directes entre le RE et d'autres familles de facteurs transcriptionnels, comme par exemple les protéines fos/jun qui régulent l'expression de gènes nécessaires au phénotype invasif et métastatique (52).

Il a également été suggéré que les œstrogènes puissent être directement impliqués dans la carcinogénèse du sein. En effet, parmi les biotransformations que subissent les

œstrogènes naturels de par leur important métabolisme oxydatif par les enzymes du cytochrome P-450, des hydroxylations aux positions 2 et 4 sont observées (53). Les œstrogènes catéchols ainsi formés, peuvent par la suite être oxydés en des espèces chimiquement réactives (quinones ou semiquinones) qui s'associent de façon covalente et irréversible à des protéines ou l'ADN, initiant vraisemblablement par cet intermédiaire certains des phénomènes responsables de la carcinogénicité des œstrogènes (54). Un autre métabolite, la 16 $\alpha$ -hydroxyestrone, semble également induire des effets néfastes, essentiellement en favorisant l'hyperprolifération cellulaire et en endommageant l'ADN (55).

Enfin, des données récentes ont révélé que chez l'humain, le coactivateur RAC3 (aussi identifié comme AIB1 « Amplified in Breast Cancer - 1 ») est surexprimé dans les tumeurs du sein mais pas dans le tissu normal avoisinant, suggérant que la surexpression de ce coactivateur peut contribuer à l'action altérée de l'œstrogène durant la carcinogenèse du sein (56, 57).

### ***2.5.2 Signification pronostique du RE et des protéines œstrogéno-régulées dans les cancers du sein***

Le récepteur d'œstrogène, après avoir été activé par les œstrogènes, agit comme un facteur transcriptionnel en régulant l'expression de certains gènes qui apparaissent jouer un rôle primordial dans la prolifération des cancers du sein. Cependant, de nombreuses études cliniques ont montré que le contenu en récepteur œstrogénique d'une tumeur est associé à un pronostic d'évolution favorable (7, 58-62). Ce résultat apparaît paradoxal compte tenu de l'action mitotique des œstrogènes. Il est probablement associé au fait que les tumeurs RE-positives sont souvent histologiquement mieux différenciées et présentent une prolifération restreinte. La détection du récepteur œstrogénique fonctionnel a donc été utilisée en routine hospitalière comme un marqueur de différenciation et de bon pronostic chez les patientes ayant un cancer du sein.

Parmi les protéines induites par les œstrogènes dans les cancers du sein, certaines, telles que le récepteur de la progestérone (RP) sont associées à l'expression et à la

fonctionnalité du RE. Le dosage de ce récepteur est utilisé en clinique pour compléter la valeur pronostique du RE et pour établir le diagnostic d'hormono-dépendance de la tumeur permettant d'engager un traitement par les anticœstrogènes (7, 58, 60-62). La concentration de ces deux récepteurs (RE et RP) dans les tumeurs mammaires est habituellement déterminée à partir d'échantillons de biopsie et le seuil de positivité est fixé arbitrairement à 10 fmol/mg de protéine.

La protéine sécrétée pS2 et la pro-cathepsine D sont à la fois régulées par les œstrogènes et par les facteurs de croissance mais présentent des valeurs pronostiques très différentes. La protéine pS2 est associée comme le RP à un bon pronostic et s'avère utile pour tester la sensibilité à un traitement par les anticœstrogènes (63). Par contre, le dosage cytosolique de la cathepsine D est associé à un mauvais pronostic et au développement métastatique. Cette différence est due au fait que la cathepsine D, contrairement au RP et à la protéine pS2, est surexprimée constitutivement dans les cancers RE-négatifs (64).

Il existe également d'autres protéines œstrogéno-régulées dont l'expression n'est pas restreinte aux cancers RE-positifs et qui seraient associées à un plus mauvais pronostic (c-erb B2, protéine du choc thermique hsp27, ...).

### ***3- Tomographie d'Émission par Positrons***

De nos jours, des efforts intensifs sont mis en œuvre pour mieux comprendre les voies de l'expression génétique qui codent pour des procédés biologiques normaux, tels que la réplication, la communication cellulaire, ou de nombreuses autres fonctions; mais également dans l'identification des altérations de cette expression génétique qui conduisent aux erreurs moléculaires fondamentales impliquées dans le développement de nombreuses maladies. L'imagerie moléculaire, qui se situe à la rencontre de la biologie et de la médecine, fournit alors une technologie indispensable pour examiner les mécanismes moléculaires qui interviennent dans de tels systèmes biologiques, généralement par l'intermédiaire de sondes moléculaires (65). De nombreuses



technologies ont été et sont encore en cours de développement pour atteindre ces objectifs, telles que la diffraction par rayonnement X, la microscopie électronique, l'imagerie optique, l'autoradiographie, l'IRM, le SPECT et la TEP. Chacune de ces techniques a des applications uniques, des avantages et également des limites (Tableau II, réf. 66).

**Tableau II.** Comparaisons de modalités d'imagerie fonctionnelle et/ou biochimique

	Résolution temporelle	Résolution spatiale	Sensibilité
<b>IRM</b>	3 – 5 sec	1.0 – 1.5 mm	$10^{-3}$ molaire (mM)
<b>SPECT</b>	> 60 sec	6 – 8 mm	$10^{-12}$ molaire (pM)
<b>TEP</b>	15 – 30 sec	4 mm	$10^{-12}$ molaire

### 3.1 Principe en TEP

La TEP est une technique d'imagerie analytique en médecine nucléaire qui utilise des molécules, en très faible quantité, marquées avec des émetteurs de positron pour imager et mesurer la fonction de procédés biologiques avec le minimum de perturbation. De nombreuses drogues ou agents biochimiquement actifs ont ainsi été radiomarqués et utilisés lors d'études *in vivo*. Durant l'ensemble des événements qui régissent la distribution d'un traceur, comme son administration, sa recirculation dans le sang, son accumulation et son élimination des organes et des tissus, la continuelle décroissance des radionucléides génère des positrons qui s'annihilent à l'échelle du millimètre avec un électron de la matière; créant de cette façon une paire de rayonnements gamma de forte énergie (511 KeV) qui sortent rapidement du corps. Ces rayonnements gamma, émis approximativement à  $180^\circ$  l'un de l'autre, sont alors détectés en coïncidence par les anneaux de détecteurs de la caméra TEP et utilisés pour générer les images topographiques (67).

La détection externe des radiotraceurs émetteurs de positron ne permet pas seulement de visualiser la disposition du radiotraceur dans le corps, mais également d'effectuer des mesures précises de la concentration en traceur dans des régions d'intérêt ou des tissus,

ainsi que leurs changements au cours du temps. Les modèles cinétiques utilisés en TEP permettent par conséquent de quantifier des procédés biochimiques et physiologiques par l'intermédiaire d'estimation *in vivo* de paramètres, tels que le flux sanguin, le pH d'un tissu, l'énergie métabolique, la vitesse de biosynthèse de protéines ou le métabolisme d'acides gras. Ainsi, si des ligands spécifiques à un récepteur sont marqués alors on peut obtenir une quantification de la densité en récepteurs ainsi que les cinétiques de liaison, mais également permettre la détermination de la sélectivité de liaison pour une population qui contiendrait différents récepteurs.

### 3.2 Radionucléides émetteurs de positron

Le principal avantage des radionucléides les plus communément employés en TEP est leur homologie avec les atomes contenus dans l'ensemble des molécules naturelles et dans la plupart des drogues, tels que le carbone ( $^{11}\text{C}$ ), l'azote ( $^{13}\text{N}$ ), l'oxygène ( $^{15}\text{O}$ ) et le fluor ( $^{18}\text{F}$ ). Mais, de nombreux autres émetteurs de positron sont disponibles, ce qui permet de jouir d'une grande diversité vis à vis des propriétés chimiques et de désintégration, et par conséquent de pouvoir adapter le choix du radionucléide en fonction du modèle biologique étudié (Tableau III).

Le fluor-18 est généralement le radionucléide de prédilection pour les applications oncologiques, tandis que le carbone-11, l'azote-13 et l'oxygène-15 sont fréquemment utilisés dans des systèmes où les cinétiques de captation sont plus courtes comme l'imagerie cardiaque et/ou cérébrale (68, 69). D'autres radionucléides, tels que le cuivre-64, disposent de demi-vies plus longues et permettent le marquage de biomolécules dont l'accumulation dans le tissu cible demande plus de temps, telles que les anticorps monoclonaux, les peptides ou les oligonucléotides (70). Dans l'ensemble, ces radionucléides sont facilement produits (selon les réactions nucléaires décrites dans la dernière colonne du Tableau III) avec des cyclotrons médicaux et à de très fortes activités spécifiques, ce qui signifie que pour une quantité donnée de radioactivité la quantité de substance est très petite.

**Tableau III.** Propriétés de désintégration et production des principaux radionucléides utilisés en tomographie d'émission par positrons

Isotope	Demi-vie	Modes de décroissance / %	Energie max $\beta^+$ (MeV)	Réaction
$^{18}\text{F}$	109.7 m	$\beta^+$ / 96.9 (EC 3.1%)	0.64	$^{18}\text{O}$ (p,n)
$^{11}\text{C}$	20.4 m	$\beta^+$ / 99.0 (EC 1.0%)	0.97	$^{14}\text{N}$ (p, $\alpha$ )
$^{13}\text{N}$	9.9 m	$\beta^+$ / 100%	1.20	$^{16}\text{O}$ (p, $\alpha$ )
$^{15}\text{O}$	2.1 m	$\beta^+$ / 99.9 (EC 0.1%)	1.74	$^{15}\text{N}$ (p,n)
$^{64}\text{Cu}$	12.7 h	$\beta^+$ / 19.0 (EC 43.0%) $\beta^-$ / 38.0	0.66	$^{64}\text{Ni}$ (p,n)
$^{124}\text{I}$	4.2 j	$\beta^+$ / 25.0 (EC 75.0%)	2.15	$^{124}\text{Te}$ (p,n)

### 3.3 Le Fluor-18: Production et utilisation

#### 3.3.1 Propriétés physico-chimiques des drogues fluorées

Le rayon atomique du fluor est comparable à celui de l'hydrogène, ce qui implique que les effets stériques engendrés par la substitution d'un hydrogène par un fluor n'interféreront pas lors de la liaison de la drogue substituée (Tableau IV). Par contre, l'hydrogène et le fluor ont des propriétés électroniques très différentes. Le fluor est l'élément le plus électronégatif du tableau périodique et les changements au sein de la distribution électronique d'une molécule, après le remplacement d'un atome d'hydrogène par un fluor, peuvent altérer ses propriétés biochimiques (comme le  $\text{pK}_a$ , les moments dipolaires et même la réactivité et la stabilité des groupes fonctionnels voisins). Par contre, la liaison carbone-fluor est une des plus fortes observées en chimie organique, ce qui lui procure une grande stabilité *in vivo* (71). Une autre stratégie communément utilisée en chimie médicinale consiste à effectuer un remplacement isostérique d'un groupe hydroxyle. Cette substitution est généralement basée sur la prémisse que le fluor peut accepter une liaison hydrogène parallèlement à l'oxygène d'une fonction hydroxyle.

**Tableau IV.** Comparaison des propriétés physico-chimiques du fluor avec celles des atomes à substituer

Elément	Electro-négativité	Longueur de liaison (CH <sub>2</sub> X, Å)	Rayon de Van der Waals (Å)	Energie de liaison (kcal/mol)
H	2.1	1.09	1.20	99
F	4.0	1.39	1.35	116
O(OH)	3.5	1.43	1.40	85

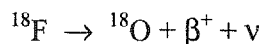
La présence d'un atome de fluor dans un composé pharmacologiquement actif peut influencer ses propriétés biologiques (72). En effet, la fluoration accroît généralement la lipophilicité d'une molécule et donc peut contribuer à faciliter son passage à travers les membranes, ou à interagir avec des sites de liaison spécifiques sur les récepteurs ou les enzymes. Mais, la présence d'un fluor peut également altérer le potentiel d'oxydation d'un système aromatique et ainsi modifier la vitesse de son oxydation et la formation de quinones.

Cependant, avant de considérer la fluoration comme une stratégie synthétique pour altérer la disposition d'une drogue, il est impératif de déterminer si les changements des propriétés physico-chimiques diminuent l'activité pharmacologique inhérente de la drogue. Les techniques de modélisation moléculaire peuvent alors, en théorie, être utilisées pour examiner : (a) l'importance du groupe devant être remplacé dans l'interaction drogue-récepteur et (b) si la liaison C-F résultante peut fournir la même interaction chimique avec le récepteur (Annexe V).

### ***3.3.2 Caractéristiques du Fluor-18***

Le fluor-18 décroît à 96.9% par l'émission d'un électron chargé positivement (positron ou  $\beta^+$ ) et d'un neutrino ( $\nu$ ). Cette émission est le résultat de la transformation dans le noyau d'un proton en neutron et le nucléide qui est formé lors de ce procédé est

l'oxygène-18. Les 3.1% restants de la désintégration du fluor-18 s'effectue par capture électronique.



Au cours de la dernière décennie, le fluor-18 a joué un rôle très important dans le développement de la tomographie d'émission par positrons et son émergence en médecine nucléaire, via le marquage de nombreuses molécules biologiques et principalement le 2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoro-2-déoxy-D-glucose ([ $^{18}\text{F}$ ]FDG) (73-75). Le fluor-18 est, de par ses propriétés chimiques et nucléaires, un radionucléide émetteur de positron presque idéal. Sa demi-vie de 110 minutes est optimale pour la radiochimie et l'imagerie TEP ainsi que pour les études cinétiques qui en découlent. De plus, la faible énergie de son positron permet d'obtenir des images avec une forte résolution. Enfin, l'introduction d'un fluor dans une molécule ne crée pas de changements stériques significatifs; mais elle peut affecter les propriétés physico-chimiques et donc le comportement biologique du composé marqué.

De nombreuses études TEP requièrent un radiotracer avec une forte activité spécifique et par conséquent le développement d'une méthode de préparation efficace du [ $^{18}\text{F}$ ]fluorure sans ajout de transporteur (« no-carrier-added » ou n.c.a.) a certainement largement contribué à l'utilisation radiochimique et biomédicale de ce radionucléide.

### **3.3.3 Méthodes de production du Fluor-18**

Le fluor-18 peut être produit sous sa forme électrophilique ([ $^{18}\text{F}$ ]F<sub>2</sub>) ou nucléophile ([ $^{18}\text{F}$ ]F<sup>-</sup>) (76). De nombreuses réactions nucléaires permettent d'obtenir du fluor-18 sous l'une ou l'autre de ces deux formes (Tableau V). De nos jours, deux systèmes de cible sont principalement utilisés pour la production de fluor-18, la cible de néon (5 et 6) et la cible d'eau enrichie en oxygène-18 (1). Les cibles à base de néon permettent de produire le fluor-18 sous sa forme électrophilique ou nucléophile selon le gaz (F<sub>2</sub> ou H<sub>2</sub>) qui est ajouté à celui qui constitue la cible. Ainsi, l'ajout d'hydrogène au néon de la cible mène à la formation *in situ* de H[ $^{18}\text{F}$ ]. Le [ $^{18}\text{F}$ ]fluorure est alors récupéré

sous la forme de  $\text{H}[^{18}\text{F}]$  anhydre en utilisant un flux d'hydrogène, ou sous la forme de  $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$  aqueux en rinçant la cible avec une petite quantité d'eau. Par contre, lorsque la cible est constituée du mélange gazeux néon/fluor (99:1), la réaction nucléaire conduit à la formation de  $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ , espèce très réactive qui peut interagir avec les parois de la cible. La cible doit donc être auparavant traitée avec  $\text{F}_2$ , pour « passiver » ses parois. Le fluor ajouté à la cible sert de gaz transporteur et facilite le transport de la forme radioactive de la cible à l'unité de synthèse.

**Tableau V.** Méthodes de production du F-18

	Réaction	Cible	Energie du faisceau (MeV)	Produit	Production (MBq/ $\mu\text{Ah}$ )
1 <sup>(77, 78)</sup>	$^{18}\text{O} (\text{p},\text{n})$	$\text{H}_2^{18}\text{O}$	11 15	$[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$	1500 2200
2 <sup>(79)</sup>	$^{16}\text{O} (^3\text{He},\text{p})$	$\text{H}_2\text{O}$	22	$[^{18}\text{F}]\text{F}^-$	200-400
3 <sup>(80)</sup>	$^{16}\text{O} (\alpha,\text{pn})$	$\text{H}_2\text{O}$	30	$[^{18}\text{F}]\text{F}^-$	40
4 <sup>(81)</sup>	$^{16}\text{O} (^3\text{H},\text{n})^{\text{a}}$	$\text{Li}_2\text{CO}_3$	-	$[^{18}\text{F}]\text{F}^-$	1100-3700
5 <sup>(82)</sup>	$^{20}\text{Ne} (\text{d},\alpha)$	$\text{F}_2/\text{Ne}$	11	$[^{18}\text{F}]\text{F}_2$	400
6 <sup>(82)</sup>	$^{20}\text{Ne} (\text{d},\alpha)$	$\text{H}_2/\text{Ne}$	11	$\text{H}[^{18}\text{F}]$	400

<sup>a</sup>  $^3\text{H}$  est produit par la réaction  $^6\text{Li} (\text{n},\alpha) ^3\text{H}$  dans un réacteur nucléaire.

Une autre alternative très intéressante, de par sa fiabilité et le fort rendement de la réaction nucléaire, est la production du  $[^{18}\text{F}]\text{fluorure}$  à partir de  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ . Le principal inconvénient de cette méthode est la faible production et distribution d'eau enrichie en oxygène-18 à travers le monde et par conséquent son coût élevé (\$150/g) qui impose une minimisation du volume de la cible et une récupération efficace de l'eau après le bombardement. Les deux cibles dont nous disposons sont basées sur ce principe et sont de composition identique, puisque le cœur de chacune d'entre elles est en niobium (Annexe VI). Le reste est en aluminium, et leur unique distinction provient du volume de la cavité retenant  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  (respectivement 1.6 et 1.8 mL). La cavité est refroidie à l'arrière de la cible par de l'eau, tandis qu'un flux d'hélium est utilisé pour la feuille de havar qui constitue l'avant de la cible. Le refroidissement de la cible est très important à cause de la

grande quantité d'énergie qui est déposée dans un faible volume d'eau. L'énergie initiale du faisceau de proton est de 15.3 MeV, mais des pertes approximatives de 1 MeV sont estimées au niveau des deux feuilles de havar qui assurent l'étanchéité de la cible. Enfin, les rendements obtenus pour la plus grande des deux cibles sont de 0.6 mCi/ $\mu$ Amin à des courants de faisceau de 35  $\mu$ A.

### 3.3.4 *Activité spécifique*

L'activité spécifique est par définition la quantité de radioactivité (Becquerel, Bq ou Curie, Ci) par unité de matière (mol), et est généralement exprimée en GBq/ $\mu$ mol ou Ci/mmol. L'activité spécifique maximale du fluor-18, avec une demi-vie de 109.7 min, est de  $1.7 \times 10^6$  Ci/mmol (63,000 GBq/ $\mu$ mol). Les études de récepteur nécessitent des agents radiopharmaceutiques avec de fortes activités spécifiques, puisque la concentration de ces récepteurs dans le corps humain est faible. Ainsi, une activité spécifique minimale de 1000 Ci/mmol (40 GBq/ $\mu$ mol) est nécessaire pour les études concernant les récepteurs stéroïdiens (83).

La présence de fluor-19 non-radioactif résulte en une diminution importante de l'activité spécifique du fluor-18 produit et doit par conséquent être exclue du mélange réactionnel lors des synthèses radiochimiques. L'utilisation de fluor-18 électrophile, provenant des cibles Ne/F<sub>2</sub>, n'est donc pas adaptée aux études biologiques relatives aux récepteurs. Le fluorure-18 sans ajout de transporteur (« no-carrier-added » ou n.c.a.) a ainsi été préféré pour l'ensemble des expériences décrites dans cette thèse.

L'activité spécifique d'un composé marqué peut être déterminée selon plusieurs méthodes. Elle peut être évaluée au cours de la purification HPLC, en mesurant et comparant l'absorption UV à celle d'un standard connu, ce qui permet l'estimation de la quantité de matière co-éluee avec le pic radioactif. L'activation neutronique, les tests de liaison *in vitro*, et le GC-MS ont également été proposés pour la détermination de l'activité spécifique.

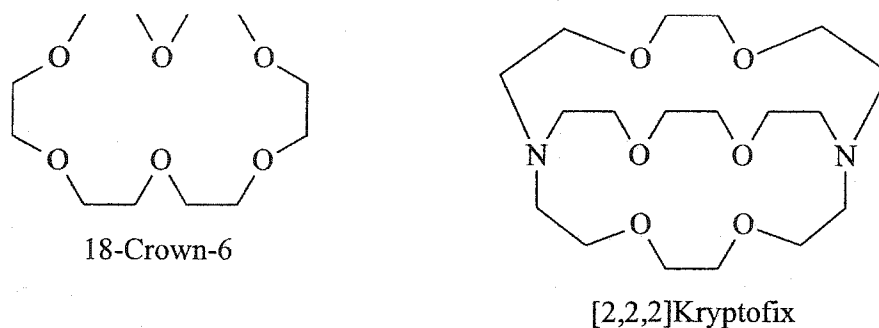
### 3.3.5 Chimie du [ $^{18}\text{F}$ ]fluorure

Le fluor est l'élément le plus électronégatif du tableau périodique et il est un des trois éléments (N, O, F) qui peuvent agir comme accepteur de liaison hydrogène. L'ion fluorure est par conséquent fortement solvatoé dans les solvants protiques, tels que l'eau ou le méthanol. L'utilisation de solvants protiques ou même la présence d'eau dans le mélange réactionnel conduit à une diminution dramatique de la réactivité du [ $^{18}\text{F}$ ]fluorure. Par conséquent, il est nécessaire d'obtenir le [ $^{18}\text{F}$ ]fluorure dans des conditions anhydres avant son utilisation pour le marquage, et de le manipuler dans des solvants aprotiques tels que l'acétonitrile, le DMSO ou le DMF. La méthode la plus utilisée pour obtenir le [ $^{18}\text{F}$ ]fluorure anhydre est sa fixation sur une résine échangeuse d'ion (84). Cette technique permet également la récupération de l'eau enrichie en oxygène-18 en vue d'une réutilisation pour la production de fluor-18 et rend également le temps nécessaire à la première étape d'évaporation, pour obtenir le [ $^{18}\text{F}$ ]fluorure anhydre, superflu. Ensuite, le [ $^{18}\text{F}$ ]fluorure est récupéré en éluant la colonne avec une solution électrolytique contenant un catalyseur de transfert de phase, ce qui résulte en une solution pratiquement anhydre de [ $^{18}\text{F}$ ]fluorure.

Plusieurs catalyseurs de transfert de phase ont été utilisés pour augmenter la solubilité du [ $^{18}\text{F}$ ]fluorure dans les solvants organiques tels que le 18-crown-6, le [2,2,2]Kryptofix et l'hydroxyde de tétrabutylammonium (85-87). L'instabilité thermique des sels quaternaires d'ammonium empêche l'utilisation de l'hydroxyde de tétrabutylammonium comme catalyseur de transfert de phase dans de nombreuses réactions, et par conséquent les polyéthers, tels que le 18-crown-6 et le [2,2,2]Kryptofix, qui ont été appliqués à la chimie du fluor-18 avec succès, sont souvent préférés. Le pouvoir de solvation des polyéthers crown, en vertu de la présence des nombreuses paires d'électrons isolées sur les oxygène qui peuvent coordonner les métaux électroniquement déficients, tels que le potassium ou le magnésium dans les réactifs de Grignard, est très fort. Les éthers Crown se lient fortement aux cations, et particulièrement à ceux dont le rayon ionique est le mieux adapté à la taille de la cavité du polyéther. Ce concept a ensuite été étendu avec



succès à des polyéthers à trois dimensions ([2,2,2]Kryptofix), appelés cryptands, et qui sont fortement sélectifs pour se lier aux métaux alcalins (Figure 4).



**Figure 4.** Structures chimiques des cryptands 18-crown-6 et [2,2,2]Kryptofix

Les éthers Crown et les cryptands sont des agents de transport ionique, qui s'organisent autour des ions potassium par coordination et solubilisent ainsi l'anion [ $^{18}\text{F}$ ]fluorure dans les solvants organiques. Mais, le [2,2,2]Kryptofix est de nos jours le catalyseur de transfert de phase le plus employé pour la radiochimie du fluor-18, car sa stabilité thermique est bonne et la re-solubilisation du [ $^{18}\text{F}$ ]fluorure dans un solvant organique est généralement meilleure que celle acquise avec le 18-crown-6. Enfin, pour disposer du fluorure-18 dans des conditions anhydres pour le radiomarquage, le complexe  $(\text{K}/\text{K}_{222})^+ / [\text{F}^-]$  obtenu à l'issue de la chromatographie sur la colonne échangeuse d'ion est généralement asséché en effectuant deux à trois distillations azéotropiques successives avec de l'acétonitrile.

Les réactions chimiques de fluoration envisagées se doivent d'être très performantes de part la courte demi-vie, la quantité produite et la solubilité du fluorure-18. De plus, bien que les réactions organiques de fluoration utilisent en général un large excès de fluorure par rapport au substrat, les réactions radiochimiques avec le fluorure-18 sont indéniablement dans la situation inverse, avec des rapports molaires [ $^{18}\text{F}$ ]F $^-$ /substrat de l'ordre de  $10^{-6}$  à  $10^{-4}$ . Ainsi, la préparation de composés [ $^{18}\text{F}$ ]fluorés sous des conditions n.c.a constituent souvent un véritable challenge synthétique. Enfin, l'échelle nanomolaire à laquelle les réactions de substitution avec le fluorure-18 sont réalisées demande impartialement une grande pureté des réactifs, puisque même la plus petite impureté peut

considérablement diminuer la réactivité du fluorure-18 et avoir des effets désastreux sur le rendement de la réaction. Une source d'impuretés souvent rencontrée est la présence de traces d'ions métalliques, vraisemblablement introduits lors de l'irradiation de l'eau enrichie en oxygène-18, et qui forment des complexes avec le fluorure-18, le rendant non-disponible pour la réaction de substitution. Enfin, malgré la présence du catalyseur de transfert de phase, une faible partie du fluorure reste généralement indisponible pour la réaction de substitution à cause de l'adhésion ou l'adsorption des ions fluorure principalement sur les parois de la vaisselle de réaction (88).

## *4- Récepteurs et TEP*

La majorité des cancers du sein sont hormonaux dépendants, comme indiqué par les augmentations des concentrations en RE et RP dans les tumeurs. 60 à 70% des tumeurs mammaires sont considérées comme RE(+) et environ 70 à 80% de ces cancers sont également positifs en récepteurs de progestérone (7, 58, 61). A cause de la grande corrélation qui existe entre ces deux récepteurs, le diagnostic *in vivo* des tumeurs du sein positives en récepteurs peut en principe être obtenu avec des agents radiopharmaceutiques basés sur l'une ou l'autre de ces familles d'hormones stéroïdiennes: œstrogène ou progestérone.

Cependant, leur capacité respective à servir d'agent de diagnostic est différente, puisque la fréquence de positivité en RE dans le cancer du sein est légèrement plus élevée que celle en RP. De plus, il apparaît d'après le modèle d'évaluation des radioligands potentiels pour les récepteurs stéroïdaux, développé par Eckelman et basé sur les constantes de dissociation à l'équilibre des ligands naturels pour leurs récepteurs, que le système œstrogène-RE soit supérieur au système progestérone-RP (89, 90). Ce modèle évalue les ligands en terme de leur affinité de liaison pour le récepteur, ce qui correspond plus spécifiquement au rapport de la concentration en récepteur du tissu cible ( $R_0$ ) et de la constante de dissociation à l'équilibre du ligand ( $K_d$ ). Le rapport  $R_0/K_d$  devrait alors prédire le rapport de traceur lié sur traceur libre dans des conditions d'équilibre (Tableau VI).

**Tableau VI.** Concentrations des récepteurs hormonaux nucléaires de l'œstrogène et de la progestérone dans des tissus d'intérêt

Système de récepteur	Site ciblé	Concentration (Ro ; nM)	Stéroïde (Kd ; nM)	Ro/Kd
Œstrogène	Utérus (rat immature)	30	Estradiol (0.2)	150
	Tumeur du sein humaine	0.3 - 3		1.5 - 15
Progestine	Utérus (rat immature)	60	Progestérone (3.0)	20
	Tumeur du sein humaine	0.3 - 3		0.1 - 1

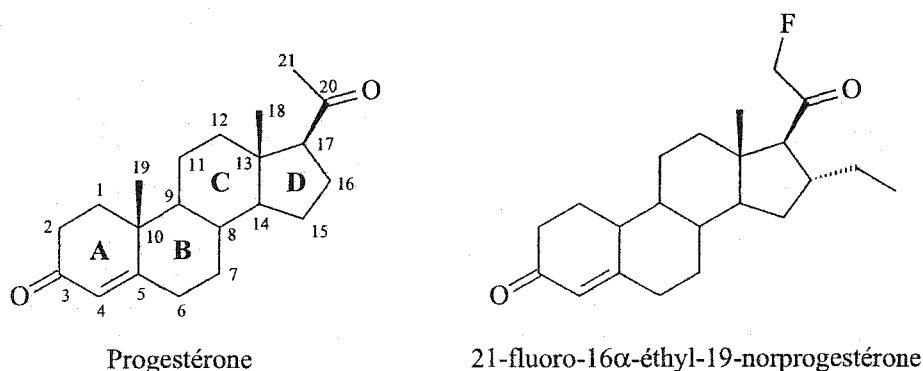
Les résultats présentés dans le tableau indiquent que les rapports (récepteur lié sur ligand libre) sont supérieurs pour le système œstrogène-RE que pour le système progestérone-RP et par conséquent le développement d'un radioligand, spécifique aux récepteurs exprimés dans les tumeurs du sein, devrait préférentiellement être basé sur les œstrogènes. Ces résultats proviennent principalement du fait que l'affinité du ligand naturel du système progestérone est nettement inférieure à celle de son homologue pour le système œstrogène. Cependant, il faut prendre en considération que même si ce modèle est utile pour effectuer la comparaison de différents ligands et de leurs cibles potentielles en terme de leur capacité relative à générer des contrastes (lié/libre), il reste relativement simpliste et il ignore que la distribution in vivo est rarement un phénomène d'équilibre, ainsi que l'impact du métabolisme et la contribution des liaisons non-spécifiques.

## 4.1 Récepteurs de progestérone

Les récepteurs de progestérone (RP) sont présents dans l'utérus, dans quelques tumeurs mammaires et dans le cerveau. Le RP est une protéine induite par l'œstrogène dans les cancers du sein, et sa concentration dépend directement du taux en œstrogène endogène. Cette caractéristique a été utilisée en clinique pour améliorer la corrélation

entre la positivité en récepteurs des tumeurs du sein et la réponse à une thérapie hormonale. En effet, la présence du RP indique la présence d'un RE fonctionnel et distingue ainsi ces tumeurs de celles qui sont RE(+) mais dont les récepteurs peuvent avoir été altérés, et ne répondent pas au traitement antioestrogénique. Ainsi, l'évaluation *in vivo* du contenu en RP des tumeurs mammaires avec un agent radiopharmaceutique basé sur la progestérone devrait fournir, malgré sa plus faible sensibilité, une valeur prédictive de la réponse à la thérapie endocrine plus fiable que les radioœstrogènes. Un autre avantage de la visualisation des RP par rapport à celle des RE est la possibilité que le patient soit sous un régime thérapeutique d'antioestrogène lors de l'examen TEP. En effet, les niveaux d'antioestrogène ou de ses métabolites en circulation durant le traitement sont tellement importants, que les récepteurs d'œstrogène sont complètement saturés. Par contre, les RP restent disponibles et leur concentration peut même augmenter pendant le traitement (91, 92).

Plusieurs dérivés radiomarqués de la puissante progestérone ont été développés pour imager les récepteurs RP du cancer du sein en TEP (93-95). Un des dérivés qui a été le plus étudié est la 21-fluoro-16 $\alpha$ -éthyl-19-norprogestérone (FENP), un analogue de la puissante progestérone ORG 2058 (Figure 5). Malheureusement, le diagnostic avec ce composé chez les patients atteints d'un cancer du sein est moins efficace que lors des essais avec des analogues œstrogéniques, probablement à cause de son métabolisme trop rapide dans le sang (96, 97).



**Figure 5.** Représentation des structures chimiques de la progestérone et de la 21-fluoro-16 $\alpha$ -éthyl-19-norprogestérone (FENP)

## 4.2 Récepteurs d'œstrogène

Le statut en RE de la tumeur est considéré depuis longtemps comme un facteur de pronostic important pour les patients atteints du cancer du sein (98). En effet, il est reconnu que le cancer du sein positif en RE est une maladie moins agressive que le cancer négatif en RE; les tumeurs RE(+) ont lieu plus communément chez les femmes post-ménopausées, et sont caractérisées par des intervalles sans rechute plus long et un plus grand taux de survie (61, 98, 99). De plus le statut en RE permet de diriger le patient vers la thérapie la plus appropriée, car la majorité des cancers RE(+), environ 60%, répondent à la thérapie hormonale (100). Or, le contenu en RE et RP des cancers du sein sont actuellement estimés en effectuant des mesures *in vitro* sur des échantillons de biopsie, ce qui toutefois ne procure qu'une information limitée sur la fonctionnalité du récepteur et la réponse potentielle de ces tumeurs à la thérapie hormonale (101). La rémission du cancer est ainsi observée chez seulement 55 à 60% des patients identifiés avec des tumeurs RE(+), tandis que 5 à 10% des patients considérés comme RE(-) répondent tout de même à ce genre de traitement. Enfin, les mesures *in vitro* ne peuvent tenir compte de l'hétérogénéité intrinsèque de la distribution des RE au sein d'une tumeur, ainsi que de la possible discordance sur le statut en RE entre la tumeur primaire et les lésions métastatiques chez un patient (102). Par conséquent, une méthode qui permettrait d'évaluer la fonctionnalité des récepteurs serait d'une importance critique pour identifier les patients dont la maladie est moins agressive et qui pourraient bénéficier d'une thérapie hormonale. Ainsi, au cours des dernières décennies, des efforts importants ont été accomplis pour identifier un radioligand avec une forte affinité pour le RE et des propriétés adéquates à l'imagerie, menant à la synthèse de nombreux composés stéroïdaux et non-stéroïdaux marqués avec le  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{75}\text{Br}$ ,  $^{123}\text{I}$  et  $^{18}\text{F}$  (103, 104).

## 4.3 Pharmacocinétique

Les œstrogènes se lient en général avec une forte affinité à leur récepteur, et ce système récepteur-ligand fournit un mécanisme idéal pour l'accumulation sélective de

radioestrogènes à l'intérieur des tumeurs RE(+). Le ligand devra cependant répondre à certains critères pour permettre une détection efficace et sélective des tumeurs du sein, tels qu'être muni d'une forte affinité de liaison pour les RE et d'une faible affinité pour les liaisons non-spécifiques, mais aussi de caractéristiques métaboliques et pharmacocinétique appropriées (105). La concentration relativement faible de récepteurs au niveau des cellules de cancer du sein (environ 10000/cellule ou une partie par million des protéines cellulaires) et l'affinité du RE pour ces ligands, généralement de subnanomolaire à nanomolaire, imposent également une contrainte au niveau de l'activité spécifique du ligand synthétisé (104). En effet, pour éviter la saturation et assurer le maximum de liaison du ligand radioactif aux récepteurs, l'activité spécifique devra être forte (un minimum de 40 GBq/ $\mu$ mol ou 1000 Ci/mmol est généralement accepté).

#### **4.2.1 Affinité de liaison**

L'issue fondamentale pour un agent de diagnostic est la résolution, c'est à dire sa capacité à s'accumuler préférentiellement dans le tissu cible par rapport aux tissus non-cibles avoisinants. Dans le cas des agents radiopharmaceutiques à base d'œstrogène, il s'agit plus précisément de détecter les tumeurs qui contiennent des récepteurs et de pouvoir en quantifier le contenu afin de guider le clinicien dans la planification du traitement. Par conséquent, il apparaît clairement qu'une forte affinité de liaison pour le RE soit initialement une caractéristique indéniable pour un bon candidat. En effet, une forte affinité du nouveau ligand pour son récepteur est essentielle à l'accumulation et la rétention au cours du temps du radioligand dans l'organe d'intérêt. L'évaluation de l'affinité de liaison, appelée RBA, d'un ligand pour le récepteur d'œstrogène est conventionnellement effectuée par un test *in vitro* de compétition radiométrique par rapport au ligand naturel ( $E_2$ ) (83). Les seuls paramètres qui varient d'un laboratoire à l'autre, sont généralement la source de la protéine (RE de rat, d'agneau, humain, ...) et la température (de 0 à 37°C) à laquelle le test est réalisé (35). La mesure du RBA effectuée directement sur des cellules humaines de cancer du sein riches en RE (MCF-7), rend compte d'une affinité de liaison plus réaliste car elle prend en considération le passage du

stéroïde à travers la membrane cellulaire et le métabolisme auquel il est confronté avant de se lier au RE (106).

Toutefois, bien que l'affinité de liaison d'un nouveau ligand pour le RE fournisse une information élémentaire pour évaluer son potentiel en tant qu'agent radiopharmaceutique, la notion de contraste reste primordiale. Ainsi, le ligand doit présenter une forte sélectivité de liaison, c'est à dire qu'il doit non seulement se lier fortement à son récepteur, mais sa rétention par les tissus non-cibles doit être la plus minime possible. Deux techniques sont généralement utilisées pour évaluer la sélectivité de liaison: soit *in vitro* en estimant grâce aux coefficients de partage octanol/eau ou par HPLC en phase inverse la contribution des liaisons non-spécifiques qui sont dépendantes de la lipophilicité de la molécule, ou soit *in vivo* par les rapports de captation entre le tissu cible et les tissus non-cibles (83, 107).

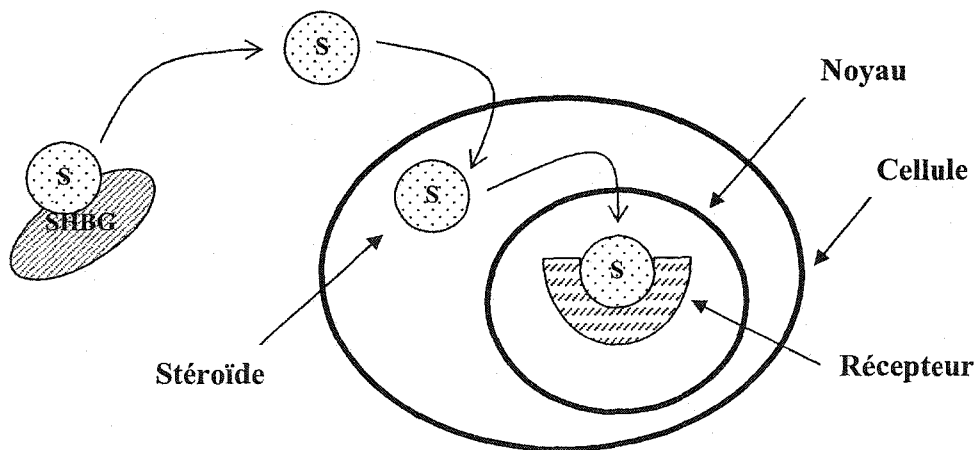
Un autre paramètre qui peut influencer la sélectivité de liaison *in vivo* d'un ligand, est son interaction avec les protéines plasmatiques (108). Ainsi, deux mesures complémentaires de RBA, avec l'alphafétoprotéine (AFP) qui est exprimée chez le rat et avec la protéine humaine de transport des hormones stéroïdiennes sexuelles (SHBG), sont souvent effectuées pour permettre une meilleure interprétation de la biodistribution d'un radioligand chez l'animal et l'humain.

#### **4.2.2 Protéine de transport des hormones sexuelles (SHBG)**

Le récepteur d'œstrogène est situé dans le noyau, mais n'est pas exprimé sur la membrane externe de la cellule. Par conséquent, la détection et la mesure du contenu en RE ne peuvent être effectuées que si le ligand réussit à entrer dans la cellule avant de se lier au récepteur et donc d'être retenu dans la cellule. Chez le rat et l'humain, il a été démontré que le  $16\alpha$ -[ $^{18}\text{F}$ ]fluoro- $17\beta$ -estradiol (FES), le radioœstrogène le plus communément employé en clinique, est lié à 95% à des protéines dans le plasma. Il est alors indéniable que ces protéines affecteront le transport du traceur du sang jusqu'à la cellule. Les principales protéines auxquelles se lient les stéroïdes chez les humains sont

l'albumine et la SHBG (109). La liaison de l'œstradiol à l'albumine est non-spécifique, et bien que l'affinité de la protéine pour l'œstradiol soit relativement faible, la forte concentration de cette protéine dans le plasma est responsable de l'importante contribution de cette liaison. Or, il a été suggéré que la liaison non-spécifique des œstrogènes à l'albumine ne facilite pas leur transport vers le récepteur situé à l'intérieur de la cellule, et ne les protège pas non plus du métabolisme.

La SHBG est une protéine de transport pour les hormones stéroïdiennes sexuelles et est spécifique aux androgènes et œstrogènes chez l'humain. La protéine est une glycoprotéine homodimérique qui se lie à une molécule de stéroïde par dimère. Cette protéine n'est pas exprimée chez le rat et la souris, et la SHBG du lapin est uniquement spécifique aux androgènes. Les concentrations typiques de SHBG observées dans le sérum humain sont assez faibles, de l'ordre de 50 nM chez les hommes et les femmes ménopausées, 85 nM chez les femmes en pré-ménopause, et augmente considérablement lors de la grossesse (> 600 nM dans le dernier trimestre) ou dans certaines conditions pathologiques. Il est cependant difficile de prédire comment la liaison à la SHBG peut perturber la distribution d'un traceur puisque trois modèles différents, mais cohérents, ont été avancés pour décrire l'action de cette protéine. La première hypothèse sur la fonction des SHBG consiste en la régulation de la concentration des stéroïdes libres dans le plasma (Figure 6, réf. 110).



**Figure 6.** Représentation schématique de l'action de l'hormone selon l'hypothèse de « l'hormone libre »



En effet, les hormones sexuelles stéroïdiennes sont de petites molécules hydrophobiques, et la liaison à ces protéines de transport permettrait la solubilisation de ces molécules dans les vaisseaux sanguins et les fluides extracellulaires. Puis, elles s'en dissocient avant d'entrer dans la cellule cible pour exercer leur action biologique. Les hormones stéroïdiennes peuvent ainsi persister dans le sang pendant des heures, en étant protégées du métabolisme.

Cependant, la découverte récente de récepteurs spécifiques à la SHBG sur les membranes cellulaires de nombreux tissus, suggère un rôle plus élargi de cette glycoprotéine. Il apparaît que les cellules qui contiennent le RE ont également des récepteurs pour la SHBG exprimés sur l'extérieur de la membrane cellulaire. Il existe cependant plusieurs modèles qui décrivent le procédé complet par lequel le stéroïde, la protéine SHBG et le récepteur en surface de la cellule interagissent pour délivrer le stéroïde de l'extérieur de la cellule au RE à l'intérieur du noyau cellulaire. Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer les interactions entre le stéroïde, la SHBG, et le récepteur à l'extérieur de la membrane cellulaire :

1. Le complexe préformé SHBG-stéroïde se lie au récepteur et ensuite le stéroïde est délivré à l'intérieur de la cellule (111).
2. La SHBG libre se fixe au récepteur et ensuite le stéroïde libre se lie au complexe récepteur-SHBG (112).

Ces deux modèles mènent cependant à des prédictions différentes sur comment la liaison du stéroïde à la SHBG affectera la capture cellulaire du stéroïde. Le premier modèle de la liaison du complexe stéroïde-SHBG préformé au récepteur prédirait que plus le complexe est fortement lié, plus grande sera la quantité de stéroïde lié à la cellule, et présumément un transport plus important du stéroïde vers l'intérieur de la cellule. Par contre, le second modèle de liaison nécessiterait une affinité optimale du stéroïde pour la SHBG afin de maximiser le transport dans la cellule. En effet, si l'affinité du stéroïde pour la SHBG est forte, alors la quantité de stéroïde libre disponible pour se lier au complexe SHBG-récepteur serait faible, étant donné que la concentration de SHBG en circulation est

toujours nettement plus forte que celle de la SHBG liée aux cellules. Par contre, une affinité faible du stéroïde pour la SHBG augmenterait la concentration du stéroïde libre en circulation, mais réduirait la probabilité d'interaction entre le stéroïde et le complexe SHBG-récepteur.

Toutefois, la capture cellulaire prédite par chacun de ces modèles sera elle-même affectée par le procédé par lequel le stéroïde se déplacera du complexe stéroïde-SHBG-récepteur situé à l'extérieur de la cellule vers le cytosol. Les mécanismes proposés pour ce transport sont fondés sur l'internalisation du complexe entier ou sur la diffusion du stéroïde à partir du complexe vers le cytosol.

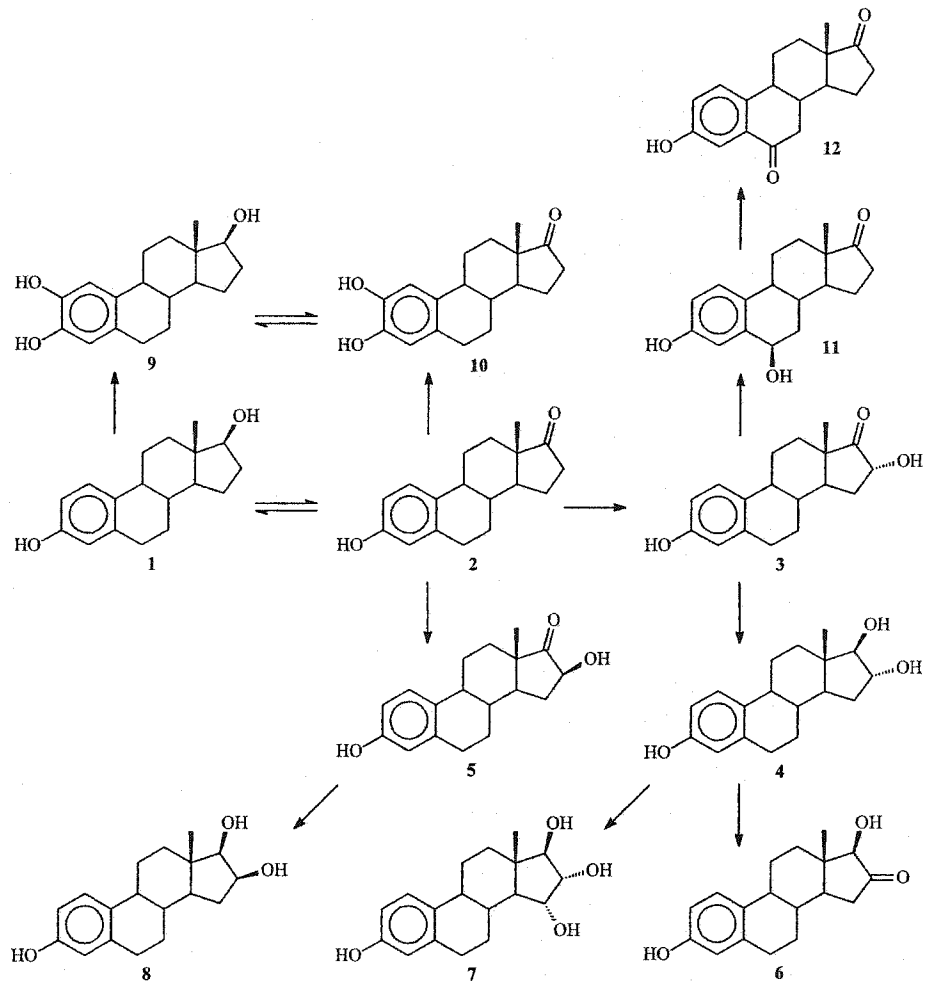
- Le mécanisme de diffusion à travers la membrane cellulaire lipidique prédirait que plus l'affinité du stéroïde pour la SHBG est forte, plus la diffusion du stéroïde à travers la membrane serait lente.
- Le modèle reposant sur l'internalisation donnerait par contre des résultats qui sont indépendants de l'affinité SBP-stéroïde.

A l'issue de ces observations, les voies mécanistiques par lesquelles le transport et la capture des stéroïdes se produisent semblent encore confuses, et ne permettent nullement de prédire comment la SHBG intervient sur la distribution *in vivo* des radiostéroïdes.

### **4.2.3 Métabolisme**

La première phase des transformations métaboliques de l'estradiol implique des oxydations et/ou des réductions sur les cycles A et D du stéroïde (Figure 7, réf. 113). La principale transformation métabolique sur le cycle D résulte en la conversion réversible et rapide de l'estradiol (1) en estrone (2). Ce dernier est également un excellent substrat pour les enzymes oxydantes. Il en résulte des oxydations aux positions 16 $\alpha$  et 16 $\beta$  qui, après réduction du groupe carbonyle en position 17, donne les estriols (4 et 8). Des oxydations ultérieures ont déjà été observées sur le cycle D, aboutissant aux œstrogènes 15 $\alpha$ -hydroxy (7) et 16-oxo (6). La phase I du métabolisme sur le cycle A de l'estradiol est principalement caractérisée par la formation d'œstrogènes catéchols (9 et 10). Des hydroxylations aux positions 6 et 11 ont déjà été constatées, mais ces phénomènes sont

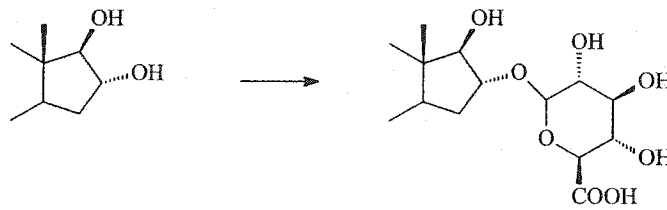
relativement minoritaires par rapport aux réactions précédemment citées. On peut par conséquent émettre l'hypothèse que l'introduction de substitutants aux sites des principales oxydations, ou adjacents à ces sites, influencera le profil métabolique de l'œstrogène.



**Figure 7.** Première phase des transformations métaboliques de l'œstradiol

La phase II du métabolisme est constituée principalement de trois réactions, dites de conjugaison.

- La glucuronidation, qui a lieu essentiellement sur les groupements hydroxyles du cycle D, et plus fréquemment à la position 16 $\alpha$  que 17 $\beta$ .



**Figure 8.** Glucuronidation. Réaction de la phase II du métabolisme de E<sub>2</sub>

- La sulfatation, qui implique le groupe 3-OH du cycle phénolique.



**Figure 9.** Sulfatation. Réaction de la phase II du métabolisme de E<sub>2</sub>

- La *O*-méthylation, qui est observée seulement sur les œstrogènes catéchols.



**Figure 10.** *O*-Méthylation. Réaction de la phase II du métabolisme de E<sub>2</sub>

Toutes les transformations métaboliques décrites précédemment auront des implications importantes sur la distribution des dérivés radiomarqués. En effet, la capture dans l'organe cible est principalement effectuée par le ligand non-métabolisé et par conséquent la conversion en métabolites diminue la quantité de ligand intact disponible pour se lier au récepteur. Ainsi, les ligands qui résistent le mieux au métabolisme continuent de s'accumuler dans l'organe cible au cours du temps et produisent des contrastes cible/non-cibles plus forts. La voie principale du métabolisme pour les hormones stéroïdiennes passe par le foie, et les composés désactivés, c'est à dire les conjugués solubles dans l'eau, sont excrétés par le système hépatobiliaire et les reins.

## 5- Agents Radiopharmaceutiques pour l'imagerie TEP des RE

Plusieurs paramètres doivent être pris en considération lors du développement et la synthèse d'un agent radiopharmaceutique pour l'imagerie des récepteurs d'œstrogène. Premièrement, il faut choisir un radionucléide qui possède des propriétés physiques optimales pour l'imagerie scintigraphique tout en minimisant l'exposition du patient aux radiations. En second lieu, le traceur devrait démontrer des propriétés biologiques et biochimiques précises. Les critères auxquels un agent radiopharmaceutique devrait répondre sont : une grande affinité et spécificité pour les RE, une stabilité biochimique et métabolique *in vivo*, une très faible liaison non-spécifique, et une grande activité spécifique.

### 5.1 Fluorotamoxifène (FTX)

La grande affinité du tamoxifène pour les RE a encouragé plusieurs laboratoires à synthétiser un dérivé TEP mimétique de cet agent thérapeutique. Le fluor a tout d'abord été attaché directement sur l'un des cycles aromatiques de la molécule (1), puis il a été démontré qu'il était plus avantageux de le fixer sur la chaîne aliphatique (2) (Figure 11, réf. 114-116).

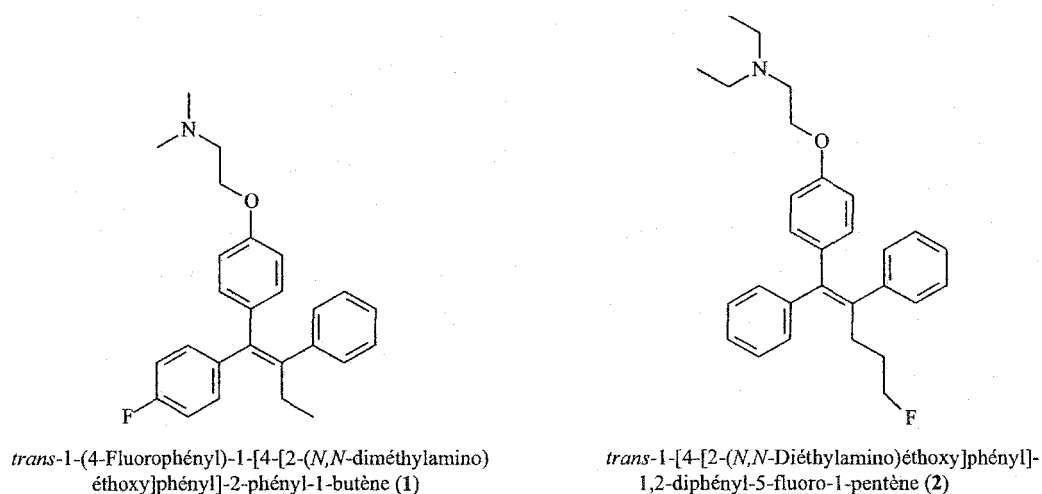
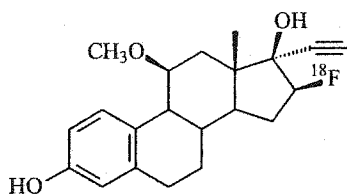


Figure 11. Structures chimiques du fluorotamoxifène (FTX)

Les études cliniques ont permis de démontrer que le FTX (2) permettait la localisation des tumeurs primaires ainsi que des métastases chez des patients atteints du cancer du sein (116, 117). De plus, dans les cas avancés de cancers du sein récidivants ou métastatiques, le FTX (2) prédit efficacement la réponse à la thérapie hormonale des tumeurs. Cependant, ces études ont été menées sur un nombre limité de patientes, et de plus amples études s'imposent afin de confirmer ces résultats prometteurs.

## 5.2 $\beta$ FMOX

Le design du 17 $\alpha$ -éthynyl-16 $\beta$ -[ $^{18}$ F]fluoro-11 $\beta$ -méthoxyestradiol ( $\beta$ FMOX) a été soigneusement orchestré pour diminuer le métabolisme, augmenter le RBA pour les RE, réduire les liaisons non-spécifiques, et diminuer l'affinité de liaison pour les protéines du sérum, telles que la SHBG (Figure 12). Ainsi, la substitution 17 $\alpha$ -éthynyl a été envisagée pour augmenter le potentiel du  $\beta$ FMOX en diminuant la vitesse de sa dégradation métabolique. Les données préliminaires de biodistribution chez la rate immature suggéraient que ce composé serait supérieur en tant qu'agent imageant des tumeurs du sein RE(+) au FES, qui est actuellement considéré comme le radioligand de référence pour la détermination des densités de RE dans les tumeurs du sein à cause de son succès clinique. En effet, le  $\beta$ FMOX est le radioligand le plus prometteur à avoir été évalué chez l'animal, avec des données de biodistribution qui ont montré une capture utérine deux fois supérieure à celle du FES, et des contrastes utérus/sang et utérus/muscle plus élevés (118, 119).



17 $\alpha$ -Éthynyl-16 $\beta$ -[ $^{18}$ F]fluoro-11 $\beta$ -méthoxyestradiol ( $\beta$ FMOX)

**Figure 12.** Structure chimique du 17 $\alpha$ -éthynyl-16 $\beta$ -[ $^{18}$ F]fluoro-11 $\beta$ -méthoxyestradiol ( $\beta$ FMOX)

Cependant, l'utilisation clinique du  $\beta$ FMOX a été décevante (120). L'étude regroupait 12 femmes, 5 lésions bénignes, 3 cancers RE(+) et 4 cancers RE(-). Mais, aucune des lésions n'a montré une accumulation focale du  $\beta$ FMOX. Les auteurs ont alors indiqué que le manque d'affinité du  $\beta$ FMOX pour les SHBG, protéines impliquées dans le transport des œstrogènes chez l'humain et qui les protégeraient du métabolisme, serait la cause de l'absence du  $\beta$ FMOX dans les lésions RE(+).

## 5.3 FES

### 5.3.1 Radiomarquage au Fluor-18 du FES

Le marquage des dérivés de l'estradiol, utilisés pour l'imagerie des densités de RE dans les tumeurs du sein, a été conventionnellement réalisé en position 16 $\alpha$ . Deux méthodes ont été élaborées pour introduire le fluor-18 à cette position (Figure 13):

- la première consiste en une réaction  $S_N2$  à partir du  $n\text{-Bu}_4\text{N}[^{18}\text{F}]\text{F}$  sur un intermédiaire 3,16 $\beta$ -bis(triflate) de l'estrone et suivie de la réduction de la cétone en position 17 par le  $\text{LiAlH}_4$  (121, 87).
- la seconde repose sur la réaction de déplacement par le fluorure-18 d'un intermédiaire cyclique 16 $\beta$ ,17 $\beta$ -sulfate de l'estradiol, suivie d'une hydrolyse en milieu acide (122-125).

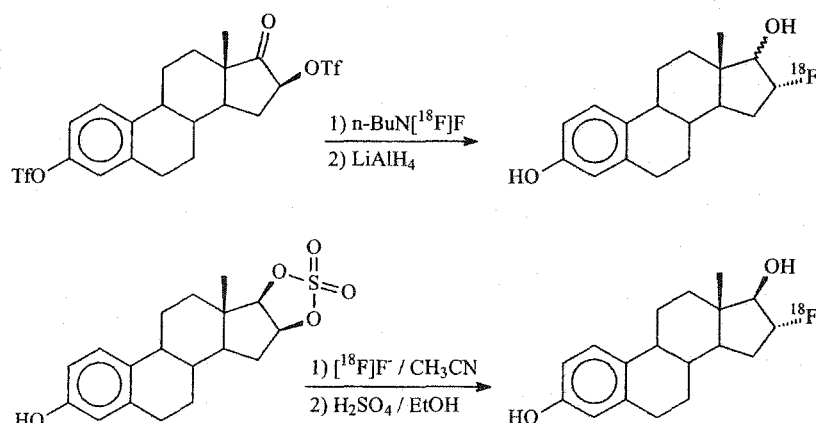


Figure 13. Radiomarquage au fluor-18 des œstrogènes à la position 16 $\alpha$

La deuxième voie synthétique présente plusieurs avantages par rapport à la première :

- le rendement radiochimique est supérieur (généralement 50 à 60% versus 30 à 50% pour la synthèse avec l'intermédiaire triflate).
- le temps nécessaire à la synthèse est plus court (60 min contre 70 à 110 min).

Mais, ces différences entre les deux synthèses sont principalement dues à la nécessité de séparer les épimères  $17\alpha/\beta$ -OH à la suite de la réaction de réduction dans le cadre de la première voie synthétique.

### ***5.3.2 Succès cliniques du FES***

Le  $16\alpha$ -[ $^{18}\text{F}$ ]fluoro- $17\beta$ -estradiol (FES) est sans doute l'analogue de l'œstrogène le plus prometteur à avoir été identifié de nos jours (126). En effet, les études cliniques qui ont été menées avec le FES ont permis d'imager les cancers du sein RE(+) avec succès et de déterminer avec précision leur contenu en récepteurs d'œstrogène. Une excellente corrélation a été démontrée entre la capture de FES par la tumeur (mesurée sur les images TEP et exprimée en % de la dose injectée par millilitre) dans les cancers primaires du sein et la concentration en RE déterminée par la mesure *in vitro* (127). L'examen TEP avec le FES a également démontré une forte sensibilité (93%) pour détecter les foyers métastatiques chez des patients avec un bilan métastatique connu (128). De plus, l'accumulation de FES à l'intérieur des lésions métastatiques diminue à la suite de l'institution d'une thérapie au tamoxifène (129). Les changements induits par le tamoxifène sur la capture de FES sont présumément reliés à l'indisponibilité des RE pour interagir avec le FES, à cause de leur occupation par le tamoxifène et ses métabolites bioactifs. Cette propriété du FES peut être très utile pour évaluer la disponibilité des RE fonctionnels, juger de la thérapie antiœstrogénique la plus appropriée, et prédire la probabilité de réponse à cette thérapie.

Ainsi la détermination non-invasive du statut en RE du cancer du sein est possible en utilisant la TEP-FES. Cette technique *in vivo* a plusieurs avantages sur la technique *in vitro* actuellement utilisée pour la détermination de la concentration en RE des tumeurs. En premier lieu, la TEP-FES permet de connaître l'hétérogénéité intrinsèque de



l'expression du récepteur à l'intérieur de chaque lésion et d'établir la concordance ou la discordance entre la tumeur primaire et les lésions récurrentes ou métastatiques. Cette information permet de choisir le mode de thérapie chez des patients avec métastases (130). De plus la véritable disponibilité in vivo des récepteurs peut être évaluée grâce à la TEP-FES, ce qui lui confère de meilleurs résultats que la mesure in vitro sur la prédiction du succès de la thérapie hormonale.

### ***5.3.3 Métabolisme du FES***

Les nombreux succès cliniques du FES lui confère indiscutablement le statut de radioœstrogène référence, et son utilisation en routine hospitalière semble progressivement se démocratiser. Cependant, malgré les nombreux avantages précédemment évoqués du FES, il apparaît qu'il soit métabolisé relativement rapidement et convertit en radiométabolites. Cette conversion empêche malheureusement une localisation optimale de cet agent radiopharmaceutique au niveau des sites riches en RE, et induit probablement des implications néfastes au niveau de l'interprétation quantitative des images obtenues lors d'un examen TEP-FES.

Le FES est structurellement assez similaire à l'estradiol, et partage ainsi la plupart de son comportement pharmacocinétique, comme une capture et un métabolisme rapide par le foie. Par contre, les biotransformations que subissent ces deux œstrogènes sont significativement différentes. A l'instar de l'estradiol, où le métabolisme est dominé par la déshydrogénation de la fonction  $17\beta$ -hydroxyle suivie préférentiellement par des hydroxylations aromatiques (C-2) et/ou alicycliques (C-15 ou C-16) plutôt que par la formation de conjugués, le métabolisme du FES est dominé essentiellement par l'hydroxylation en C-2 et une formation de conjugués excessive (131). En effet, l'halogène en C-16 inhibe l'hydroxylation sur le C-15 et C-16, et restreint l'activité de l'alcool déshydrogénase résultant en l'oxydation du  $17\beta$ -hydroxyle.

L'analyse, chez l'humain, des radiométabolites du sang et de l'urine suggère qu'ils sont essentiellement constitués de conjugués sulfates et glucuronidates du FES (132, 133). Ces

métabolites sont polaires et négativement chargés. Ils n'ont pas la faculté de se lier spécifiquement à la SHBG mais, par analogie aux conjugués de l'estradiol, peuvent certainement se fixer à l'albumine (134). Enfin, ils ne pénètrent vraisemblablement pas à l'intérieur de la cellule pour se lier aux récepteurs nucléaires. Néanmoins, leur présence dans le sang et potentiellement dans l'espace extracellulaire crée un bruit de fond perturbateur pour l'interprétation analytique des images acquises à l'issue de la capture de FES par les sites riches en RE.

## II- Article I

---

**Seimbille, Y.;** Rousseau, J.; Bénard, F.; Ali, H.; van Lier, J.E.  
Synthesis of 2,16 $\alpha$ - and 4,16 $\alpha$ -[16 $\alpha$ -<sup>18</sup>F]difluoroestradiols and  
their 11 $\beta$ -methoxy derivatives for estrogen receptor imaging. *J.*  
*Labelled Cpd. Radiopharm.* 2001, 44, S348-S350.

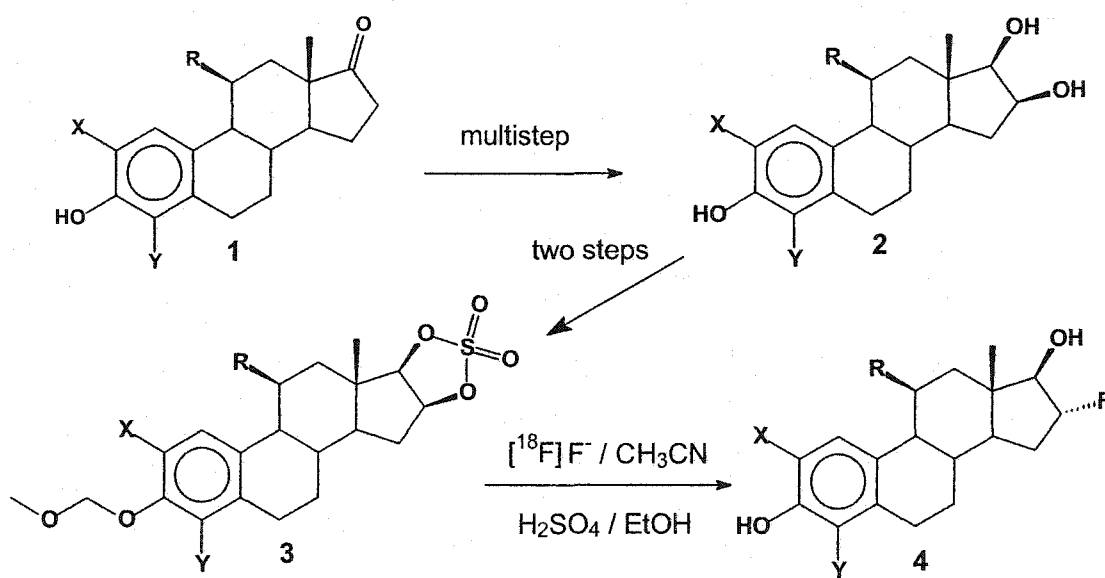
# SYNTHESIS OF 2,16 $\alpha$ - AND 4,16 $\alpha$ -[16 $\alpha$ -<sup>18</sup>F]DIFLUOROESTRADIOLS AND THEIR 11 $\beta$ -METHOXY DERIVATIVES FOR ESTROGEN RECEPTOR IMAGING

Y. Seimbille, J. Rousseau, F. Bénard, H. Ali and J.E. van Lier

Sherbrooke PET Center, Department of Nuclear Medicine and Radiobiology, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada J1H 5N4

Key Words: F-18, estradiol derivatives, estrogen receptor, PET imaging

**Summary.** We have prepared the 2- and 4-fluoro derivatives of 16 $\alpha$ -[<sup>18</sup>F]fluoroestradiol (FES) (**4a,b**) and 11 $\beta$ -OMe-FES (**4c,d**). Electrophilic substitution of estrone or 11 $\beta$ -OMe-estrone with *N*-fluoropyridinium salt gave the 2- and 4-F derivatives **1**, which were converted to the triols **2** and subsequently to the reactive 16 $\beta$ ,17 $\beta$ -cyclic sulfates **3**. Stereoselective opening of the cyclic sulfates via nucleophilic fluorination with Me<sub>4</sub>NF or [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> and removal of the protecting ether and sulfate groups via rapid acid hydrolysis gave **4a-d** or [16 $\alpha$ -<sup>18</sup>F]-(**4a-d**).



a: X=F, Y=R=H    b: X=R=H, Y=F    c: X=F, Y=H, R=OMe    d: X=H, Y=F, R=OMe

Biodistribution studies in immature rats suggest that the 11 $\beta$ -OMe-4,16 $\alpha$ -[16 $\alpha$ -<sup>18</sup>F]difluoroestradiol (**4d**) is the best candidate drug among the series to provide an improved radiopharmaceutical for PET imaging of estrogen receptor (ER) densities.

**Introduction.** The determination of ER levels in breast tumors plays a crucial role in the choice of an appropriate therapy, and provides important prognostic information. At the time of recurrence, this information is particularly relevant, as second line hormone therapeutic agents can be effective even when recurrent tumors have become resistant to tamoxifen. It has been recognized for over two decades that an ER-based radiopharmaceutical could be used for the non-invasive imaging and quantification of ER as a tool to confirm or complement the information obtained from conventional diagnosis.(1) A substantial number of radiolabeled estrogens have been evaluated in animal models, but only few derivatives have been advanced to a clinical setting. Among the latter 11 $\beta$ -OMe-(17 $\alpha$ ,20Z)-[<sup>123</sup>I]iodovinylestradiol (MIVE) (2) and 16 $\alpha$ -[<sup>18</sup>F]fluoroestradiol (FES) (3) have been used successfully in breast cancer patients, using SPECT and PET imaging, respectively. FES is however readily converted to circulating radiometabolites preventing optimal localization at the ER-binding sites.(4) The sex hormone binding globulin (SHBG) is known to protect both androgens and estrogens from metabolism, and SHBG has been shown to facilitate the uptake of estrogens into target tissues.(5) The 2-[<sup>18</sup>F]fluoroestradiol shows strong binding to both ER and SHBG and has been advanced as an improved imaging agent.(6) We showed previously that the addition of a 2- or 4-F substituent onto radioiodinated estrogens slows down metabolism *in vivo* and that particularly the 4-F, either alone or in combination with an 11 $\beta$ -OMe, enhances ER-mediated target tissue uptake and selectivity in the rat.(7) On such accounts we prepared the 2- and 4-F derivatives of FES, with and without 11 $\beta$ -OMe, to study their potential for PET imaging of ER-positive target tissues.

**Results and Discussion.** The 2- and 4-F substituted FES (**4a** and **4b**) and their 11 $\beta$ -OMe analogs (**4c** and **4d**) were synthesized from estrone and 11 $\beta$ -OMe-estrone, respectively. Electrophilic substitution of the latter with N-fluoropyridinium salt (8) gave the 2- and 4-F derivatives **1a-d**, which were subsequently converted to the 3,17-enoldiacetates with

isopropenyl acetate in the presence of acid catalyst, and treated with lead tetraacetate in acetic acid to give exclusively the 3,16 $\beta$ -diacetate estrone derivatives.  $^1\text{H}$  NMR spectra of these derivatives confirmed the stereochemistry, i.e. a characteristic triplet for the 16 $\alpha$ -H at about 5 ppm vs. a deshielded broad doublet for the 16 $\beta$ -H.(9) The 17-keto compounds were reduced with lithium tri-*t*-butoxy aluminum hydride to yield the 17 $\beta$ -OH derivatives, followed by a base mediated hydrolysis to provide the triols **2a-d**. After protecting the 3-OH group as methoxymethyl (MOM) ether, the *cis* configuration of the 16- and 17-OH groups was established by the formation of the 16 $\beta$ ,17 $\beta$ -O-cyclic sulfate to give the key intermediates **3a-d**.(10) These reactive intermediates were stereoselectively opened via a nucleophilic fluorination, under anhydrous condition, with  $\text{Me}_4\text{NF}$ , followed by rapid hydrolysis of the protecting ether and sulfate groups in ethanolic-acid solution to give the non-radioactive difluoro steroids **4a-d**. The stereochemistry was confirmed by their characteristic signals in the  $^1\text{H}$  NMR spectra. The 16 $\alpha$ -F,17 $\beta$ -OH configuration was assigned from the double doublet at 3.8 ppm (17 $\alpha$ -H) and a double multiplet at 4.9 ppm (16 $\beta$ -H). This pattern is readily distinguishable from that of the 16 $\alpha$ -F,17 $\alpha$ -OH isomer, which gives a doublet at 3.8 ppm (17 $\beta$ -H) and a double multiplet at 5.2 ppm (16 $\beta$ -H). On the other hand, the 16 $\beta$ -F,17 $\beta$ -OH isomer is characterized by a double doublet at 3.4 ppm (17 $\alpha$ -H) and a double multiplet at 5.0 ppm (16 $\alpha$ -H).(11) The 16 $\alpha$ - $^{18}\text{F}$  analogs were prepared by the same route, using  $[\text{}^{18}\text{F}]\text{F}^-$  instead of  $\text{Me}_4\text{NF}$  as the fluorination agent. The  $[\text{}^{18}\text{F}]\text{F}^-$  ion was prepared by proton bombardment of an  $[\text{}^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$  target, trapped on an anion exchange resin and eluted with a solution of  $\text{K}_2\text{CO}_3$  and phase transfer catalyst Kryptofix 222 in  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ . After several azeotropic distillations to obtain anhydrous condition, the intermediates **3a-d** were stereoselectively opened via a nucleophilic fluorination with  $[\text{}^{18}\text{F}]\text{F}^-$  in  $\text{CH}_3\text{CN}$ . The solvent was evaporated and the residue was redissolved in  $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$  (100:1), kept at 110 $^\circ\text{C}$  for 10 min to hydrolyze the protecting ether and sulfate groups to yield the  $[\text{}^{18}\text{F}]$  (**4a-d**).(10) Evaporation of the solvent gave the final products that were redissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$  (10:1), dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and purified by normal-phase HPLC. The  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  retained about 20-30% of the radioactivity. Identities of the assigned structures were confirmed by comparing HPLC retention times with those of co-injected

non-radioactive analogs. Typical synthesis times were about 2 h from the end of bombardment and radiochemical yields varied between 40 to 60% (decay corrected). Specific activities, based on the limits of the UV absorption detector, were estimated >3,000 Ci/mmol.

**Acknowledgements.** Supported by the Canadian Institutes of Health Research.

## References

1. Katzenellenbogen J.A. et al. In: Receptor binding radiotracers (Eckelman W.C., ed.), Boca Raton, CRC Press, 93 (1982).
2. Rijks L.J. et al. *J. Clin. Oncol.* 15: 2536 (1997); Nachar O. et al. *J. Nucl. Med.* 40: 1728 (1999); *Idem* 41: 1324 (2000).
3. Mintun M.A. et al. *Radiology* 169: 45 (1988); McGuire A.H. et al. *J. Nucl. Med.* 32: 1526 (1991); Dehdashti F. et al. *J. Nucl. Med.* 36: 1766 (1995).
4. Mankoff D.A. et al. *Nucl. Med. Biol.* 24: 341 (1997).
5. Jonson S.D. et al. *Nucl. Med. Biol.* 26: 123 (1999).
6. Hostetler E.D. et al. *J. Org. Chem.* 64: 178 (1999).
7. Ali H. et al. *J. Med. Chem.* 36: 4255 (1993); *Idem* 36: 3061 (1993).
8. Umemoto T. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 112: 8563 (1990).
9. VanBrocklin, H.F. et al. *Steroids* 59: 34 (1994).
10. Lim, J.L. et al. *Nucl. Med. Biol.* 23: 911 (1996); Römer J. et al. *Appl. Radiat. Isot.* 47: 395 (1996).
11. Stalford, A.C. et al. *Steroids* 62: 750 (1997).

## III- Article II

---

Seimbille, Y.; Ali, H.; van Lier, J.E. Synthesis of 2,16 $\alpha$ - and 4,16 $\alpha$ -difluoroestradiols and their 11 $\beta$ -methoxy derivatives as potential estrogen receptor-binding radiopharmaceuticals. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* 2002, 5, 657-663.



## IV- Article III

---

**Seimbille, Y.;** Rousseau, J.; Bénard, F.; Morin, C.; Ali, H.; Avvakumov, G.; Hammond, G. L.; van Lier, J. E. <sup>18</sup>F-labeled difluoroestradiols: preparation and preclinical evaluation as estrogen receptor-binding radiopharmaceuticals. *Steroids*. 2002, 67, 765-775.

## V- Article IV

---

**Seimbille, Y.; Bénard, F. ; van Lier, J.E.** Synthesis of 16 $\alpha$ -fluoro ICI 182,780 derivatives: powerful antiestrogens to image estrogen receptor densities in breast cancer by positron emission tomography. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* 2002, 20, 2275-2281.

# VI- Discussion et perspectives

---

## *1- Discussion*

Le cancer du sein est de nos jours le cancer le plus fréquent et la deuxième cause de mortalité chez la femme dans les pays développés. Bien que l'incidence de cette maladie soit en constante progression depuis deux décennies, le taux de mortalité dû au cancer du sein demeure relativement stable grâce essentiellement à l'amélioration des méthodes de dépistage et de traitement. La mammographie est actuellement l'outil de prédilection pour le dépistage de cette maladie, et après un examen soupçonneux, le patient est généralement référé afin de confirmer le diagnostic établi à l'aide d'une biopsie. L'analyse pathologique de la biopsie permet également de guider le clinicien dans l'élaboration de son pronostic et dans le choix de la thérapie la plus appropriée. Un des paramètres mesurés au cours de cette analyse est la concentration en récepteurs d'œstrogène (RE) de la tumeur, car la présence des RE est considérée comme un marqueur de différenciation et de bon pronostic. En effet, les tumeurs du sein qui sont admises comme positives en RE sont généralement histologiquement mieux différenciées et présentent une prolifération restreinte, ce qui aboutit à un taux de survie supérieur à celui des cancers RE(-). Mais, la présence de RE au sein d'une lésion tumorale indique aussi la possibilité d'engager une thérapie endocrine adjuvante à base d'antiœstrogène.

Cependant, cette méthode de dosage *in vitro* n'est pas optimale à cause de son caractère invasif et de sa sensibilité (seulement 60% des tumeurs établies comme RE(+) répondent à la thérapie hormonale). En effet, cette technique est sujette à l'hétérogénéité intrinsèque de l'expression des RE dans la lésion et à la possible discordance entre la tumeur primaire et les lésions métastatiques, ce qui perturbe indiscutablement la mesure de la concentration en RE. Il est donc important de développer une technique non-invasive qui permette à la fois la visualisation et la quantification *in vivo* des RE de la tumeur primaire et des lésions récurrentes ou métastatiques en un seul examen, et qui ne serait pas affectée par l'hétérogénéité de la distribution des RE au sein des tumeurs.

Or, le développement des techniques analytiques non-invasives sophistiquées basées sur la résonance magnétique nucléaire (RMN) du fluor et la tomographie d'émission par positrons (TEP), ainsi que la découverte de nouveaux agents de fluoration ont radicalement transformé le champ d'investigation des drogues fluorées chez l'animal et l'homme (135-138). De plus, la forte affinité des œstrogènes pour leurs récepteurs procure un mécanisme idéal pour l'accumulation de radioœstrogènes à l'intérieur d'une tumeur. Ainsi, la forte sensibilité de la TEP combinée à un radioligand qui présente des caractéristiques optimales (forte affinité pour les RE, faible affinité pour les liaisons non-spécifiques, propriétés métaboliques et pharmacocinétique idéales, ...) offrent une alternative à l'analyse *in vitro* de la biopsie.

Les études expérimentales chez l'animal ou cliniques qui ont été conduites avec le 16 $\alpha$ -[<sup>18</sup>F]fluoroœstradiol (FES) ont largement démontré la faisabilité de cette procédure (139, 127-130). Cependant, le FES est métabolisé relativement rapidement, ce qui empêche une localisation optimale de cet agent radiopharmaceutique au niveau des sites riches en RE, et perturbe probablement l'interprétation quantitative des images obtenues lors d'un examen TEP-FES. Le métabolisme du FES est principalement dominé par des réactions d'hydroxylation aromatique aux positions 2 et 4 induites par les enzymes du cytochrome P-450 et en une formation excessive de conjugués (131-133). Bien que ces radiométabolites ne se lient pas ou peu aux récepteurs, ils peuvent néanmoins nuire au contraste des images TEP par leur présence prolongée dans le sang et/ou l'espace extracellulaire (134).

Nous avons donc envisagé la préparation d'une première série de composés pour bloquer ou retarder les biotransformations aromatiques du FES, et par conséquent augmenter sa bio-disponibilité *in vivo*. La stratégie synthétique consistait à introduire un atome de fluor à la position 2 ou 4 du FES, car il est connu que l'introduction d'un fluor au site d'attaque métabolique dans une molécule peut altérer la vitesse, la voie et l'étendue du métabolisme d'une drogue; étant donné que la liaison carbone-fluor est beaucoup plus résistante aux attaques chimiques directes par le cytochrome P-450 que la liaison

carbone-hydrogène (140, 141, 70). Par contre, la présence d'un fluor en ortho d'un groupe phénolique peut augmenter sa réactivité en tant que nucléophile dans les réactions de méthylation et de glucuronidation (142, 143). Des études *in vivo* ont montré que la présence d'un substituant 2-fluoro sur la molécule de E<sub>2</sub> bloque la 2-hydroxylation et la bioactivation en quinone, et oriente le métabolisme vers la glucuronidation (144-145).

Nous avons estimé préférable que le fluor aromatique ne soit pas celui qui permette d'avoir accès via la TEP à la visualisation de la pénétration de la drogue au niveau du site d'action. En effet, le radiomarquage sur le cycle aromatique via l'utilisation de [<sup>18</sup>F]F<sup>+</sup> conduit à une baisse trop significative de l'activité spécifique pour les études biologiques, et l'incorporation du fluor-18 nucléophile sur le cycle A électroniquement riche de l'estradiol, via des substitutions nucléophiles sur des sels quaternaires d'ammonium, donne des rendements radiochimiques très faibles (146). Par conséquent, nous avons préparé les dérivés 2- ou 4-fluoro du 16 $\alpha$ -[<sup>18</sup>F]fluoroestradiol plutôt que ceux de E<sub>2</sub>. De plus, l'action bénéfique du substituant 16 $\alpha$ -fluoro sur le métabolisme du cycle D du stéroïde peut contribuer à optimiser la bio-stabilité des nouveaux dérivés. En effet, l'introduction du fluor à la position 16 est connue pour bloquer non seulement l'hydroxylation en C-16 mais également en C-15 et restreindre la déshydrogénation du groupe hydroxyle en C-17 (131, 113).

Un autre avantage de l'introduction d'un deuxième atome de fluor est l'augmentation de la lipophilicité et parallèlement de la diffusion passive de la drogue à travers les membranes. Cependant, il est à considérer que la contribution des liaisons non-spécifiques lors de la distribution *in vivo* de la drogue est également directement dépendante de la lipophilicité (147). En l'occurrence, des dérivés du 2,16 $\alpha$ - et 4,16 $\alpha$ -difluoroestradiol substitués à la position 11 $\beta$  avec un groupement méthoxy ont également été préparés, puisque ce substituant a la particularité d'améliorer la sélectivité de liaison *in vivo* et de ralentir les biotransformations qui interviennent sur le cycle D (148-151).

Deux synthèses différentes ont été élaborées pour la préparation de cette première série d'agents radiopharmaceutiques. La première synthèse consiste principalement en

l'introduction des deux atomes de fluor, respectivement sur le cycle D et A de l'estrone ou de la 11 $\beta$ -méthoxyestrone, selon des substitutions électrophiles (152). Chacune de ces réactions a été conduite avec le trifluoromethanesulfonate de *N*-fluoropyridinium (NFPT) comme agent de fluoration et elles procèdent toutes selon des rendements supérieurs à 60% (153-156, 131, 137). L'étape ultime de cette synthèse est la réduction de la cétone en position 17, qui est accomplie avec l'aluminohydrure de lithium et résulte en un mélange de 4 produits finaux pour chacun des produits de départ (157). Ces mélanges sont constitués des épimères 17 $\alpha$ / $\beta$ -OH (1:2) des dérivés 2,16 $\alpha$ - et 4,16 $\alpha$ -difluoroestra-3,17-diol, ou de leurs analogues 11 $\beta$ -méthoxy. A l'issue de la séparation chromatographique des épimères, les produits désirés sont obtenus avec un rendement d'environ 15% en seulement cinq étapes. Finalement, les composés 2-fluoro ont été séparés des analogues 4-fluoro par HPLC en phase normale (avec des rapports 2-F:4-F de 3:2), puis après recristallisation ont fourni les échantillons analytiquement purs nécessaires aux études *in vitro* d'affinité de liaison.

Malheureusement, bien que la possibilité de préparer le N[<sup>18</sup>F]FPT ait déjà été avancée et pourrait en principe permettre la préparation des analogues 16 $\alpha$ -[<sup>18</sup>F]fluoro, la synthèse évoquée précédemment n'est pas adaptée à la radiochimie du fluor-18 puisque les temps nécessaires aux diverses étapes, par exemple la fluoration à la position 16 $\alpha$  (20 h), ne sont pas compatibles avec la courte demi-vie du fluor-18 (110 min) (158). Par conséquent, une autre voie synthétique, via des intermédiaires sulfates 16 $\beta$ ,17 $\beta$ -cycliques qui permettent une incorporation rapide et stéréosélective du substituant 16 $\alpha$ -fluoro à la fin de la synthèse, a été élaborée (152).

Les sulfates cycliques sont connus pour être plus réactifs que les époxydes vis à vis des nucléophiles et sont généralement assez instables dans des conditions légèrement acides (159, 122). Ils fournissent ainsi d'excellents intermédiaires pour l'introduction du substituant 16 $\alpha$ -fluoro sur le squelette d'un stéroïde. Le choix de cette procédure pour le radiomarquage de nos dérivés nous est apparu plus approprié que la voie synthétique conventionnelle, où la fluoration nucléophile est conduite avec le fluorure de tétrabutylammonium (nBu<sub>4</sub>N[<sup>18</sup>F]F) sur un intermédiaire 16 $\beta$ -OTf-17-cétonique (121, 87,

150, 160). En effet, la substitution nucléophile sur le précurseur triflate requiert préalablement la transformation du [ $^{18}\text{F}$ ]fluorure en  $n\text{Bu}_4\text{N}[^{18}\text{F}]\text{F}$  et la réduction finale de la cétone en position 17 avec le  $\text{LiAlH}_4$  impose la séparation des produits 17-OH épimériques.

La deuxième voie synthétique établie débute comme précédemment avec l'estrone ou la  $11\beta$ -méthoxyestrone, et permet d'atteindre les dérivés voulus du FES en neuf étapes. La première étape consiste à introduire le fluor sur le cycle aromatique du stéroïde à la position 2 ou 4 avec le NFPT. Ensuite, l'objectif des quatre étapes suivantes est de fonctionnaliser la position 16 en vue de préparer les diols vicinaux nécessaires à la formation des précurseurs sulfates  $16\beta,17\beta$ -cycliques. L'obtention des diols consiste tout d'abord en la conversion des produits de la SEAr en dérivés  $3,16\beta$ -diacétates de l'estrone et de la  $11\beta$ -méthoxyestrone via la formation de  $3,17$ -diacétates d'énols et le réarrangement de la fonction 17-acétate d'énol en traitant ces derniers avec le tétraacétate de plomb en milieu acide (140, 161). Ensuite, la réduction de la cétone en position 17 avec un agent réducteur doux et l'hydrolyse en milieu basique des fonctions acétates permettent d'obtenir exclusivement les diols vicinaux sur la face  $\beta$ . La préparation des précurseurs est alors complétée en protégeant le groupement hydroxyle phénolique des stéroïdes sous la forme d'éther méthoxyméthyle (MOM), puis par l'incorporation de la fonction sulfate  $16\beta,17\beta$ -cyclique en traitant les diols avec l'hydrure de sodium et le sulfonyldiimidazole (124, 125).

Après avoir séparé par HPLC les composés 2-fluoro de leurs analogues 4-fluoro, ces intermédiaires cycliques sont ensuite stéréosélectivement ouverts dans des conditions anhydres via une fluoration nucléophile avec le fluorure de tétraméthylammonium ( $\text{Me}_4\text{NF}$ ). En l'occurrence, l'attaque nucléophile des ions fluorures est plus rapide sur l'atome de carbone C-16 et sur la face  $\alpha$ , et aucun autre produit substitué n'a été observé. La substitution nucléophile procède seulement sur la face  $\alpha$ , car la présence du groupe  $18\beta$ -méthyle angulaire encombre stériquement la face  $\beta$ . De plus, bien que les positions 16 et 17 présentent une géométrie d'approche nucléophile identique, l'attaque du fluorure à la position 17 est confrontée à deux interactions H-H 1,3-diaxiales (avec les positions

12 et 13), tandis qu'à la position 16 elle n'en subit qu'une seule (avec la position 13). Apparemment, cette différence stérique est suffisante pour que le fluor soit introduit exclusivement sur le C-16 (162, 122). Finalement, l'hydrolyse des groupements protecteurs MOM et sulfate conduit aux dérivés du FES substitués à la position 2 ou 4 avec un atome de fluor, ou aux analogues méthoxylés (163, 164). Contrairement à la première synthèse qui mène au mélange épimérique  $16\alpha\text{-F}, 17\alpha/\beta\text{-OH}$ , la deuxième voie synthétique, bien que plus longue de quatre étapes, a l'avantage d'aboutir directement aux produits avec la configuration  $16\alpha\text{-F}, 17\beta\text{-OH}$  voulue et peut également être adaptée à la préparation des analogues  $16\alpha\text{-}^{18}\text{F}$  (165).

La production des différents agents radiopharmaceutiques émetteurs de positron a été automatisée afin de restreindre la dose d'exposition, et les réactions ont été réalisées sans ajout de transporteur, c'est à dire dans des conditions n.c.a., en respect avec les exigences des études sur les récepteurs stéroïdaux vis à vis de l'activité spécifique (Annexe VII, réf. 166-168). Toutes les synthèses radiochimiques ont été initiées par la récupération du matériel de la cible et l'obtention du fluorure-18 anhydre, une étape indispensable au bon déroulement de la substitution nucléophile. Il s'agissait de fixer le fluorure-18, produit par le bombardement de l'eau enrichie en oxygène-18, sur une colonne échangeuse d'ions, l'éluer avec une solution de carbonate de potassium et de [2,2,2]Kryptofix et l'assécher soigneusement par l'intermédiaire de quelques distillations azéotropiques avec l'acétonitrile. Les réactions de fluoration sont ensuite menées par l'attaque stéréosélective à la position  $16\alpha$  sur les précurseurs sulfates avec le fluorure-18 anhydre. Finalement, l'hydrolyse des deux groupements protecteurs dans une solution éthanolique acide fournit les différents agents radiopharmaceutiques.

Tous les produits finaux ont été purifiés par HPLC en phase normale, et l'excellente séparation entre le produit radiomarqué et les contaminants non-radioactifs donne des produits de très forte activité spécifique ( $>3,000$  Ci/mmol). La pureté chimique et radiochimique des agents radiopharmaceutiques a également été vérifiée par chromatographie sur couche mince. Les temps caractéristiques de radiosynthèse étaient de l'ordre de deux heures à partir de la fin du bombardement et les rendements



radiochimiques, corrigés pour la décroissance radioactive, variaient entre 30 et 50%. Enfin, l'identité de chaque agent radiopharmaceutique a été confirmée en comparant son temps de rétention sur le chromatogramme HPLC avec celui de son analogue non-radioactif co-injecté.

Les études pré-cliniques d'évaluation de ces nouveaux agents radiopharmaceutiques dédiés à la visualisation et la quantification des densités en RE dans les tumeurs du sein ont résidé en deux phases: des études *in vitro* pour déterminer et comparer les affinités de liaison des nouveaux dérivés œstrogéniques avec celles de produits de référence pour le RE et certaines protéines plasmatiques, et des études de biodistribution chez l'animal (168).

Une propriété indéniable, que doit posséder un ligand pour la détermination quantitative du contenu en RE d'une lésion tumorale, est une forte affinité de liaison pour le récepteur d'œstrogène. Deux modèles *in vitro* différents ont servi à l'évaluation de cette affinité de liaison: la mesure effectuée directement sur la protéine du RE $\alpha$  humain ou avec des cellules MCF-7 intactes. Le deuxième modèle a été choisi pour refléter de façon plus réaliste la situation *in vivo* où le ligand est exposé aux enzymes métaboliques et aux barrières de la membrane cellulaire avant de se lier au récepteur.

Les mesures d'affinité de liaison sur le RE $\alpha$  humain montre que dans tous les cas la substitution d'un hydrogène par un fluor sur le cycle aromatique diminue l'affinité de liaison par rapport à la molécule parente. Toutefois, parmi notre série de dérivés fluorés sur le cycle A, les analogues 4-F donnent systématiquement de meilleures affinités de liaison pour le RE que les analogues 2-F. Ce profile coïncide avec celui déjà observé des analogues 2- et 4-fluorés du 11 $\beta$ -méthoxy-(17 $\alpha$ ,20Z)-iodovinylestradiol (MIVE) et du 16 $\alpha$ -iodoestradiol, dérivés destinés à l'imagerie SPECT des récepteurs d'œstrogène (140, 141). De surcroît, l'addition du groupe 11 $\beta$ -OMe sur le FES résulte également en une diminution du RBA (107.7 vs. 50.9), ce qui est en accord avec une étude précédente (150).

Les valeurs de RBA mesurées sur les cellules MCF-7, bien que deux fois inférieures à celles mesurées sur la protéine immobilisée, sont en général en harmonie avec ces dernières. Cependant, la diminution du RBA due à l'ajout du 11 $\beta$ -OMe au FES est significativement plus prononcée (57.3 vs. 1.7) lorsque l'affinité de liaison est mesurée sur les cellules MCF-7. Il est très probable que cette différence soit attribuable à l'aptitude de la molécule à diffuser à travers la membrane cellulaire, une caractéristique qui corrèle en général avec sa lipophilicité. Ainsi, l'ajout d'un substituant hydrophile, tel que le méthoxy, à un stéroïde restreint son transport vers l'intérieur de la cellule, ce qui par conséquent se résume en une diminution importante du RBA dans ce modèle *in vitro*. Toutefois, ce système *in vitro* révèle également que l'effet néfaste du 11 $\beta$ -OMe sur la diffusion et par conséquent sur le RBA pour le RE, semble en partie déjouer par la fluoration aromatique qui restitue les RBA à 50% des valeurs observées avec le RE $\alpha$  humain. Cette compensation provient vraisemblablement de la contribution du fluor aromatique sur la lipophilicité des stéroïdes.

De nombreux facteurs peuvent affecter la distribution *in vivo* d'un radiostéroïde, tels que son métabolisme ou sa complexation à des protéines endogènes. Les effets de ces liaisons extracellulaires sont alors évalués à travers des mesures de RBA pour l'alphafétoprotéine (AFP) de rat ou la SHBG humaine. L'AFP, qui est surexprimée chez les rats nouveaux nés mais dont la concentration devient négligeable à l'âge de 25 jours, se lie fortement aux œstrogènes. Cette liaison peut par conséquent potentiellement affecter la captation par le tissu riche en RE chez le rat (modèle animal utilisé pour les études de biodistribution), d'où l'impératif de déterminer le RBA des nouveaux ligands pour cette protéine. De plus, la mesure de cette affinité de liaison procure également un indice de la sélectivité de liaison des nouveaux produits.

La SHBG, qui n'est pas exprimée chez le rat, est une protéine plasmatique qui se lie spécifiquement aux androgènes et aux œstrogènes chez l'humain. Les fonctions vouées à cette protéine seraient le transport des œstrogènes jusqu'aux organes riches en RE et une protection accrue contre le métabolisme. Il est donc envisageable qu'elle puisse modifier le profil de distribution d'un traceur. Toutefois, l'énigme sur son mode d'action persiste

et par conséquent il n'est pas possible actuellement, à partir des données de RBA acquises, de réellement émettre des hypothèses, du point de vue de la disponibilité et du métabolisme, sur la contribution conférée par cette protéine au succès potentiel d'un nouveau radioœstrogène.

Contrairement aux récepteurs d'œstrogène, les liaisons de ces nouveaux dérivés du FES à l'une ou l'autre de ces protéines sont altérées distinctivement par les différents atomes de fluor. En l'occurrence, il a été déterminé que l'ajout du  $16\alpha$ -F à l'estradiol n'affecte pas réellement l'affinité à l'AFP, alors qu'il crée une diminution conséquente de l'affinité de liaison pour la SHBG (20 à 40 fois). D'autre part, il a été démontré que l'ajout d'un substituant 4-F n'altère aucune de ces deux liaisons, tandis que la fluoration à la position 2 a des effets considérables (l'affinité pour l'AFP chute d'un facteur 5 et la liaison à la SHBG augmente d'un à deux ordres de magnitude). Enfin, la méthylation à la position  $11\beta$  diminue radicalement les liaisons à ces deux protéines, qui deviennent négligeables pour la SHBG et 200 fois moins importantes pour l'AFP que les liaisons des molécules parentes non-substituées à cette position. Ces observations confirment par conséquent l'hypothèse de l'action bénéfique du substituant  $11\beta$ -méthoxy sur la sélectivité de liaison. Toutefois, la controverse actuelle sur le rôle de la SHBG et les voies moléculaires par lesquelles elle exercerait son action, ne permet pas de préciser comment cette importante perte d'affinité subie par les dérivés  $11\beta$ -OMe vis à vis de cette protéine, absente chez le rat mais abondamment présente chez l'humain, peut affecter les propriétés de localisation de ces agents radiopharmaceutiques chez les patients humains. En effet, l'hypothèse de « l'hormone libre », qui est à l'origine du premier modèle qui illustre l'accumulation d'œstrogène au niveau des sites riches en RE, indique que seule l'hormone non-liée est physiologiquement active, c'est à dire que seul l'œstrogène libre ou dissocié des protéines plasmatiques peut entrer dans la cellule et exercer son action. Certaines observations, telles que l'accumulation de traceur au niveau des sites œstrogéniques du cerveau (impossibilité pour la SHBG, à cause de sa taille, de traverser la barrière hématoencéphalique) ou les mesures de RBA sur les cellules MCF-7 (réalisées en l'absence de SHBG), tendent à confirmer ce modèle dont le mécanisme est indépendant de l'action de la SHBG et essentiellement basé sur la diffusion du ligand libre.

L'accumulation de radioœstrogène aux sites riches en RE sera donc, selon ce modèle, privilégiée dépendamment de l'augmentation de la disponibilité du ligand, c'est à dire lorsque l'affinité de liaison du ligand pour la SHBG est faible ou que la dissociation du complexe œstrogène-SHBG est rapide. Cependant, la découverte récente de récepteurs spécifiques à la SHBG sur les membranes cellulaires de nombreux tissus, dont ceux qui expriment le RE, est à l'origine des deux autres modèles et suggère que la SHBG intervient dans le transport et l'accumulation de l'œstrogène dans la cellule (via la formation d'un complexe stéroïde-SHBG-récepteur de la SHBG) et pourrait également protéger le stéroïde du métabolisme. L'un de ces modèles a ainsi servi d'alibi pour expliquer l'échec clinique du  $17\alpha$ -éthynyl- $16\beta$ - $[^{18}\text{F}]$ fluoro- $11\beta$ -méthoxyestradiol ( $\beta$ FMOX), qui s'accumule fortement dans les tissus riches en RE chez l'animal mais dont la liaison à la SHBG est négligeable.

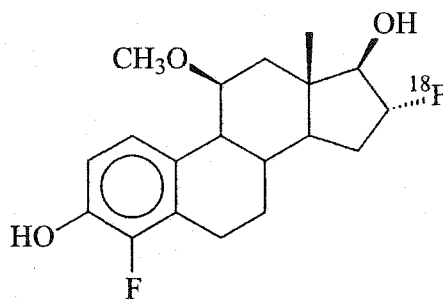
Toutefois, la coexistence de ces modèles distincts, mais cohérents, entretient l'ambiguïté autour de la véritable fonction de la SHBG et sur les conséquences de son interaction avec les œstrogènes vis à vis de leurs distributions in vivo. Ainsi, l'affinité de liaison pour la SHBG ne confère pas actuellement une valeur prédictive efficace pour évaluer le potentiel d'un nouvel agent radiopharmaceutique; et en l'absence de modèle animal adéquat, les essais cliniques restent le test ultime. Néanmoins, il est envisageable que l'évaluation clinique de nouveaux traceurs, possédant des RBA pour la SHBG très distincts, puisse aider à éclaircir notre compréhension à propos du rôle et de la contribution de cette protéine.

La deuxième phase d'évaluation pré-clinique de ces nouveaux agents radiopharmaceutiques consiste à établir le profil de biodistribution chez l'animal (rates Spague-Dawley immatures). Ces études fournissent des indications sur l'effet des différentes substitutions, fluoration aromatique et méthylation, sur la sélectivité du FES à cibler le tissu riche en RE, notamment l'utérus, et sa capacité à résister au métabolisme. Une étude de blocage, par coinjection d'un excès d'estradiol non-radioactif, a été réalisée pour chaque agent radiopharmaceutique et a permis de vérifier que leur rétention dans l'organe cible était dépendante de la disponibilité des récepteurs d'œstrogène. Le

comportement in vivo des dérivés du FES fluorés sur le cycle A coïncide avec la diminution de l'affinité de liaison pour le RE observée pour ces deux composés, puisque les captures utérines du 2-F-FES et 4-F-FES sont respectivement 72 et 20% inférieures à celle du FES au temps optimal après injection de 1-h (RBA de 43.1 et 84.9 vs. 107.7 pour le FES). Deux rapports de capture, ou de concentration, ont été établis: le rapport utérus/sang et le rapport utérus/non-cible. Nous avons choisi délibérément comme organe non-cible: le poumon, la rate et le muscle. Ces deux rapports sont représentatifs de la sélectivité de liaison et éventuellement des contrastes qui définiront les images topographiques TEP. Comme précédemment, lorsque le FES est substitué à la position 2 ou 4 par un atome de fluor, ces rapports sont inférieurs à ceux obtenus avec la molécule parente. Ces observations témoignent que la fluoration aromatique, bien qu'elle soit censée protéger la molécule du FES de l'attaque métabolique des enzymes, échoue à améliorer les propriétés de localisation du FES.

Par contre, l'ajout d'un 11 $\beta$ -méthoxy au FES a l'effet opposé: malgré une perte significative d'environ 50% de l'affinité de liaison pour le RE, la capture est accrue de 16% par rapport à celle du FES. De surcroît, l'effet bénéfique de la méthylation sur la sélectivité de liaison est confirmée par l'augmentation respective de 63 et 23% des rapports utérus/sang et utérus/non-cible vis à vis de ceux du FES. Cette augmentation de la sélectivité de liaison induite par le 11 $\beta$ -OMe avait déjà été observée auparavant pour plusieurs dérivés de l'estradiol (150, 151, 169, 170). L'observation des captures de radioactivité au niveau du foie et des reins a révélé clairement que la fluoration sur le cycle A du FES 11 $\beta$ -substitué restreint la conversion de ces dérivés en radiométabolites par rapport à la molécule parente. Or, les métabolites ont en général une faible affinité pour le RE et donc seule la molécule non-convertie est considérée être majoritairement séquestrée par le récepteur. Ainsi, la plus forte capture utérine observée au cours de cette étude est de 14.66% DI/g avec le 4,16 $\alpha$ -[16 $\alpha$ -<sup>18</sup>F]difluoro-11 $\beta$ -méthoxyestradiol (4-F-M[<sup>18</sup>F]FES), ce qui représente une augmentation de 25% de la rétention par le tissu riche en RE par rapport au FES (11.75% DI/g), qui est de nos jours la référence clinique pour la visualisation TEP des densités en RE. Les rapports de sélectivité de ce dérivé, caractérisé par les rapports utérus/sang et le utérus/non-cible, se sont également avérés,

pour toute la période d'observation, nettement supérieurs à ceux du FES, respectivement deux fois et 30%. Nous avons déjà constaté, lors des mesures de RBA sur les cellules MCF-7, que la fluoration aromatique restituait l'affinité de liaison pour le RE des dérivés méthoxylés à la position 11 $\beta$  à un niveau normal. De surcroît, les dérivés 4-fluoro exhibent toujours une affinité de liaison pour le récepteur d'œstrogène supérieure à celle de leurs analogues substitués à la position 2. Ainsi, nous pouvons faire l'hypothèse que les propriétés de localisation supérieure du 4-F-MFES proviennent non seulement de sa plus forte sélectivité de liaison, conférée essentiellement par le groupement 11 $\beta$ -méthoxy, mais sont aussi probablement reliées à la plus grande aptitude de ce produit à traverser la membrane cellulaire et/ou à une diminution des interactions avec les enzymes métaboliques, grâce principalement au substituant 4-fluoro. Finalement, aucun de ces nouveaux agents radiopharmaceutique n'a démontré une capture osseuse excessive, ce qui indique l'absence de [ $^{18}\text{F}$ ]fluorure libre et confirme la stabilité in vivo de la liaison C-F.



4,16 $\alpha$ -[16 $\alpha$ - $^{18}\text{F}$ ]Difluoro-11 $\beta$ -méthoxyestradiol (4-F-M[ $^{18}\text{F}$ ]FES)

**Figure 14.** Structure chimique du 4-F-MFES

En conclusion, le dérivé 4,16 $\alpha$ -[16 $\alpha$ - $^{18}\text{F}$ ]difluoro-11 $\beta$ -méthoxyestradiol (4-F-M[ $^{18}\text{F}$ ]FES) promet d'être un bon candidat pour l'imagerie TEP clinique des densités en RE des tumeurs du sein, puisqu'il a exhibé la plus forte capture utérine et sélectivité de liaison parmi les dérivés du FES évalués et sa stabilité in vivo, attestée par les captures osseuses, hépatiques et rénales est très bonne (Figure 14). Cependant, sa faible affinité de liaison pour la protéine SHBG pourrait affecter son potentiel comme agent radiopharmaceutique

pour les tumeurs du sein RE(+), et par conséquent une biodistribution dans un modèle animal plus approprié, qui exprimerait la SHBG et son récepteur, et/ou des études cliniques devraient donner des informations plus concluantes.

Mais, les excellentes propriétés de localisation dans le tissu cible et sa sélectivité de liaison confère indéniablement à cet agent radiopharmaceutique un avenir prometteur pour visualiser les tissus riches en RE et valider le potentiel de nouvelles thérapies pour les tumeurs positives en RE chez l'animal.

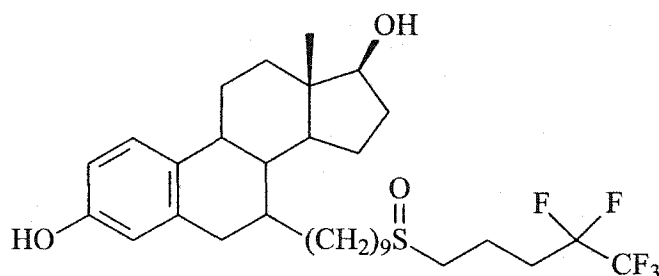
Une autre application possible de ce nouveau radioœstrogène pourrait être la visualisation des sites œstrogéniques au niveau du cerveau. En effet, originellement les œstrogènes sont connus pour leur rôle primordial dans la reproduction, mais leur caractère lipophile leur permet aisément de diffuser à travers les membranes plasmiques et la barrière hématoencéphalique pour exercer leurs actions sur certains centres cérébraux (171). Il a ainsi été identifié que les œstrogènes agissaient sur de nombreux systèmes de neurotransmetteurs, sur les régions du cerveau impliquées dans les fonctions végétatives et émotionnelles, contribuaient au développement du cerveau et intervenaient dans la protection des neurones. Mais, la réponse biologique du cerveau à la stimulation par les œstrogènes est considérée comme pouvant provenir des effets à la fois non-génomiques et génomiques, et les analyses immunohistochimiques ont révélé la présence des deux isoformes du RE dans de nombreuses régions du cerveau. Des études *in vivo* de liaison menées avec de l'estradiol tritié ou radiomarqué à l'iode ( $^{125}\text{I}$ ) ont par la suite confirmé le résultat de ces analyses et ont permis d'identifier de nouvelles zones riches en RE où les traceurs se concentraient (172, 173). Enfin, une étude conduite avec le  $^{18}\text{F}$ FES a permis l'évaluation de l'expression en RE dans des tumeurs bénignes du cerveau (174). Il est donc envisageable que le 4-F-M $^{18}\text{F}$ FES, étant donné ses excellentes propriétés de localisation, puisse aider à identifier les zones du cerveau où les œstrogènes exercent leurs actions neurotrophiques et neuroprotectrices, ainsi que les voies moléculaires qui mènent à ces actions, et qu'il puisse aussi servir à la détection des lésions cérébrales RE(+). De surcroît, la faible affinité de liaison de ce traceur pour la protéine SHBG ne devrait pas être préoccupante et peut même éventuellement faciliter la visualisation des

sites cérébraux riches en RE puisque l'accumulation du radioligand dans ces régions dépend nécessairement de la quantité de ligand libre qui peut diffuser.

Le succès de la thérapie endocrine à base d'antiœstrogène (MSRE) pour les cancers du sein RE(+) dépend directement de la capacité de ces agents thérapeutiques à se lier efficacement et sélectivement aux récepteurs d'œstrogène. Mais, cette caractéristique est également nécessaire au diagnostic de ces tumeurs, ce qui encourage à adapter à l'imagerie SPECT ou TEP des RE, les MSRE qui ont prouvé leur efficacité thérapeutique, en les marquant avec un émetteur de gamma ou de positron. Ainsi, le tamoxifène, qui est un antagoniste partiel de l'œstradiol et la drogue la plus utilisée actuellement pour le traitement des carcinomes du sein hormono-dépendants, est à l'origine de plusieurs dérivés marqués à l'iode-131 ou au fluor-18. Cependant, bien que le tamoxifène puisse inhiber à une dose thérapeutique l'activité transcriptionnelle hormono-dépendante AF-2 des récepteurs d'œstrogène qui est responsable de l'action mitotique de l'œstradiol dans le tissu mammaire, sa valeur d'affinité de liaison pour le RE n'est pas optimale et les succès cliniques obtenus avec ces dérivés radiomarqués sont mitigés. Néanmoins, le phénomène de résistance parfois observé lors du traitement des tumeurs RE(+) a mené au développement d'une nouvelle génération d'antiœstrogènes qui sont totalement dépourvus d'activité agoniste. Il s'agit en réalité de dérivés de l'œstradiol qui sont fonctionnalisés à la position  $7\alpha$  avec une chaîne latérale qui leur confère des propriétés pharmaceutiques intéressantes. Le radiomarquage de ces antiœstrogènes purs a déjà été avancé autrefois par notre groupe et plusieurs dérivés substitués à la position  $7\alpha$  avec une chaîne aliphatique undécyle, portant généralement un halogène à son extrémité, ont été préparés et évalués; mais leurs captures dans l'organe cible riche en RE se sont avérées trop faibles pour qu'ils puissent être utilisés comme agent de diagnostic (175-177). Cependant, l'arrivée du très prometteur ICI 182,780 ou  $7\alpha$ -[9-[(4,4,5,5,5-pentafluoropentyl)sulphinyl]nonyl]-œstradiol, qui démontre des propriétés de localisation nettement supérieures à celles du tamoxifène, puisque notamment son RBA pour le RE est de 133 comparativement à 3 pour le tamoxifène, nous a encouragé à préparer des dérivés TEP de ce puissant antiœstrogène (Figure 15, réf. 178, 179).



Chacun des nouveaux agents radiopharmaceutiques envisagés peut à la fois être considéré comme un dérivé mimétique du ICI 182,780 dédié à l'imagerie TEP et comme un dérivé du FES substitué à la position 7 $\alpha$ . En effet, une chaîne latérale quasi identique à celle du ICI 182,780 a été introduite à la position 7 $\alpha$  sur la structure stéroïdienne des trois nouveaux produits développés. La seule différence entre ces composés provient du degré d'oxydation de l'atome de soufre à l'intérieur de cette chaîne: sulfure, sulfoxyde ou sulfone. Finalement, parallèlement au FES, nous avons choisi de conserver le marquage radioactif à la position 16 $\alpha$ , à cause de la tolérance du récepteur pour de petits groupes polaires à cette position. Ainsi, l'incorporation du fluor-18 sur le squelette du stéroïde ne devrait pas trop affecter l'affinité de liaison des nouveaux dérivés.



7 $\alpha$ -[9-[(4,4,5,5,5-pentafluoropentyl)sulphinyl]nonyl]-estradiol (ICI 182,780)

**Figure 15.** Structure chimique du ICI 182,780

Deux méthodes ont à ce jour été identifiées pour introduire une chaîne aliphatique à la position 7 $\alpha$  de l'estradiol. La première consiste à effectuer une alkylation en  $\alpha$  d'une cétone à partir d'un halogénure d'alkyle et un dérivé 6-oxo de l'estradiol (180, 181). L'alkylation intervient par conséquent sur l'énolate de ce dérivé et a la particularité de procéder stéréosélectivement, puis elle est suivie de la désoxygénation du groupe carbonyle. Toutefois, toutes nos tentatives d'alkylation de l'énolate de notre dérivé protégé de la estra-1,3,5(10)-trien-3,16 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol-6-one ont échoué, même lorsque celui-ci était stabilisé avec  $\text{BEt}_3$  (182, 183). Il est donc envisageable que ces échecs proviennent d'un manque de réactivité des halogénures d'alkyle utilisés vis à vis du carbone nucléophile (C-7).

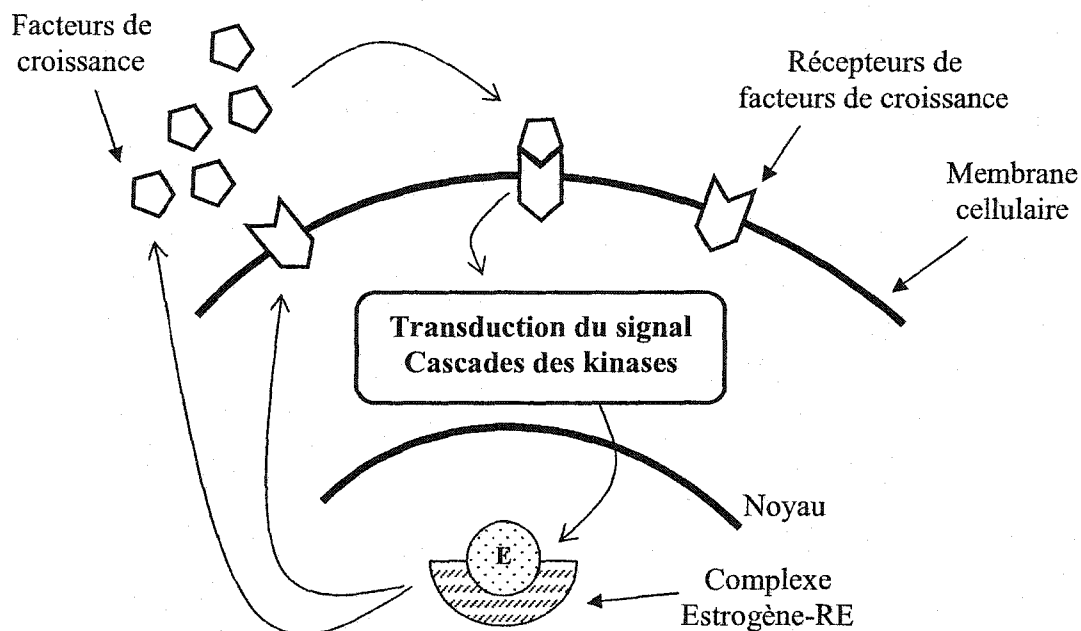
La deuxième stratégie consiste à réaliser une réaction de Grignard entre un organomagnésien et un stéroïde 4,6-dièn-3-one (184, 20). Cependant, contrairement à la première méthode, elle n'est pas stéréosélective et mène au mélange des épimères  $7\alpha/\beta$  qui doivent être ultérieurement séparés par chromatographie. De plus, cette approche impose l'aromatisation du cycle A pour recouvrer la structure de l'œstrogène (185). Ainsi, les cinq premières étapes de la synthèse consistent principalement en une réaction d'addition-1,6 catalysée par le cuivre(I) entre le bromure de 9-(diméthyl-*t*-butylsilyloxy)nonylmagnésium et la  $17\beta$ -hydroxyestra-4,6-dièn-3-one pour introduire l'amorce de la chaîne latérale à la position  $7\alpha$ , l'oxydation du groupe 17-hydroxyle et l'aromatisation du cycle A pour conduire à un œstrogène  $7\alpha$ -substitué, la  $7\alpha$ -(9-acétoxy-nonyl) estrone, avec un rendement d'environ 20% (186). L'objectif des quatre étapes suivantes est, comme précédemment pour la deuxième synthèse de la première série de dérivés du FES, de préparer le diol vicinal qui sera à la fin de la synthèse converti en des précurseurs sulfates  $16\beta,17\beta$ -cycliques sur lesquels la fluoration nucléophile sera conduite. Une fois le diol obtenu, quatre étapes sont nécessaires pour achever le substituant à la position  $7\alpha$  et ainsi obtenir une chaîne latérale parente de celle du ICI 182,780, mais à un état d'oxydation plus bas du soufre, sulfure au lieu de sulfoxyde. Ces étapes consistent tout d'abord en la protection du groupement hydroxyle phénolique du stéroïde sous la forme d'éther MOM, la tosylation de l'alcool primaire de la chaîne, puis la formation d'un dérivé thioacétate via une réaction  $S_N2$  sur le tosylate et finalement l'alkylation du thiol après sa déprotection. Le dérivé sulfure est ainsi formé en quatre étapes avec un rendement de 37%. Ensuite, une oxydation sélective du sulfure en sulfoxyde ou sulfone permet d'obtenir les deux autres dérivés  $16\beta,17\beta$ -diols. Traditionnellement, cette oxydation est effectuée avec le métapériodate de sodium, mais la capacité de cet oxydant à cliver les diols nous a encouragés à le remplacer par l'acide 3-chloro-perbenzoïque (m-CPBA) (187, 21). Cependant, un contrôle soigneux de la température et du temps de réaction est nécessaire avec cet oxydant pour éviter la sur-oxydation du sulfoxyde en sulfone (188-190). Les trois diols vicinaux sont par la suite convertis en intermédiaires sulfates  $16\beta,17\beta$ -cycliques par traitement des diols avec l'hydrure de sodium et le sulfonyldiimidazole.

Ces intermédiaires cycliques sont ensuite stéréosélectivement ouverts à la position 16 $\alpha$  dans des conditions anhydres via une fluoration nucléophile avec le Me<sub>4</sub>NF et l'hydrolyse des groupements protecteurs MOM et sulfate conduit finalement aux trois dérivés mimétiques du ICI 182,780 fluorés à la position 16 $\alpha$  (186). Les analogues 16 $\alpha$ -<sup>18</sup>F ont également été préparés et la procédure de radiomarquage au fluor-18 de ces agents radiopharmaceutiques est identique à celle décrite précédemment pour les dérivés du [<sup>18</sup>F]FES (165, 168). Ainsi, toutes les réactions ont été réalisées dans des conditions n.c.a., et consistent en une attaque stéréosélective avec le fluorure-18 anhydre à la position 16 $\alpha$  sur les précurseurs sulfates. Puis, une hydrolyse rapide des deux groupements protecteurs fournit les différents dérivés du [<sup>18</sup>F]FES substitués à la position 7 $\alpha$ . Finalement les produits sont purifiés par HPLC en phase normale, ce qui fournit des agents radiopharmaceutiques avec des activités spécifiques (>3,000 Ci/mmol) supérieures à l'activité spécifique minimale requise pour les études sur les récepteurs stéroïdaux. L'identité de chaque produit radiomarké a été confirmée en comparant son temps de rétention sur le chromatogramme HPLC avec celui de son analogue non-radioactif co-injecté. Les radiosynthèses sont effectuées en environ deux heures à partir de la fin du bombardement et les rendements radiochimiques, corrigés pour la décroissance radioactive, sont de l'ordre de 20 à 30%.

Des mesures *in vitro* à partir d'échantillons analytiquement purs de chacun de ces produits, ainsi que des études de biodistribution chez l'animal devraient nous permettre initialement d'évaluer ces trois nouveaux agents radiopharmaceutiques dédiés à l'imagerie TEP des densités de RE chez les patients atteints du cancer du sein. Toutefois, il est envisageable, si l'on considère que le substituant 16 $\alpha$ -fluoro n'interfère pas trop avec les propriétés biochimiques du ICI 182,780, que son analogue radiomarké puisse nous aider à comprendre les mécanismes moléculaires responsables de l'activité thérapeutique de cet agent et par conséquent d'élucider en partie les mécanismes d'action des MSRE.

## 2- Perspectives

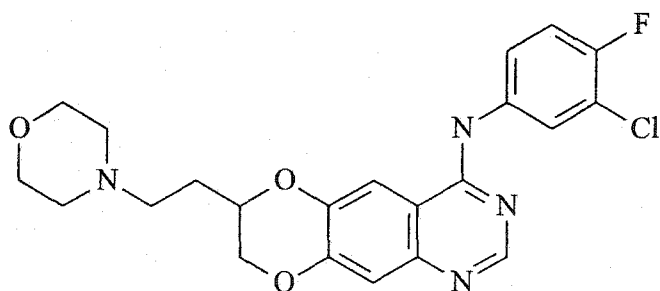
Il a été identifié depuis longtemps que le développement et la progression du cancer du sein sont généralement directement reliés aux effets des hormones œstrogènes qui agissent via leur récepteur nucléaire respectif (RE). Toutefois, des données plus récentes suggèrent que les facteurs de croissance (tels que IGF, EGF,...) ainsi que leurs molécules de signalisation seraient également impliqués dans la cancérogenèse du sein. Ces voies moléculaires disparates communiqueraient entre-elles et travailleraient souvent de concert pour altérer le phénotype cellulaire (Figure 16).



**Figure 16.** Schéma de l'inter-connection entre le récepteur d'œstrogène (RE) et les facteurs de croissance.

En effet, la liaison de l'œstrogène au RE induit l'expression de nombreux gènes dont certains qui codent pour les facteurs de croissance et leurs récepteurs. Ensuite, l'activation paracrine et/ou autocrine des récepteurs des facteurs de croissance, appartenant à la superfamille des récepteurs des kinases de la tyrosine et situés sur la

surface des cellules, par leurs ligands respectifs déclenche des cascades de signaux biochimiques qui influencent la capacité d'invasion, l'angiogenèse, la survie et la prolifération cellulaire, mais également l'activité transcriptionnelle du RE. De surcroît, il a été avancé que l'action des facteurs de croissance pourrait contribuer à la résistance de certaines tumeurs à la thérapie hormonale (191, 192). Il a ainsi été démontré que la présence du récepteur EGFR et/ou erbB2 dans les tumeurs du sein est associée à un mauvais pronostic et à une réponse négative de ces tumeurs à la thérapie endocrine. Par conséquent, bien que le RE soit une cible cellulaire efficace pour la prévention, le diagnostic et le traitement du cancer du sein, de nouvelles stratégies thérapeutiques ont été élaborées à partir des récepteurs des facteurs de croissance et des molécules de signalisation qui en découlent (193). La première possibilité est de développer des agents biologiques qui inhibent la liaison du facteur de croissance à son récepteur, comme par exemple l'anticorps trastuzumab qui se lie au domaine extracellulaire du récepteur erbB2, surexprimé dans environ 30% des cancers du sein et des ovaires (194, 195). Une autre alternative est de sélectivement cibler avec de petites molécules inhibitrices l'action des kinases (196-199). Parmi ces inhibiteurs, le ZD1839, qui est actuellement en troisième phase d'évaluation clinique, inhibe fortement et sélectivement l'activité des kinases de la tyrosine du EGFR (récepteur surexprimé dans 58% des cancers du sein) (Figure 17, réf. 200).



**Figure 17.** Structure chimique du ZD1839

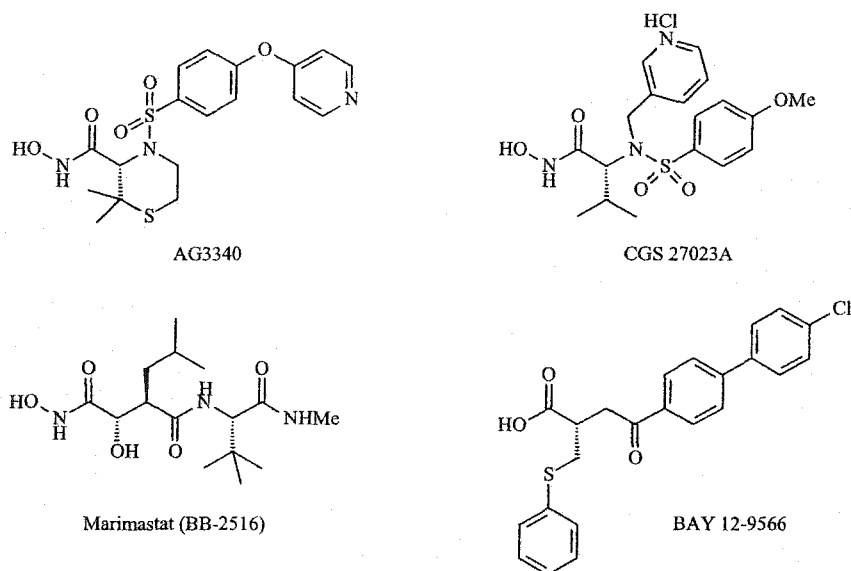
La transposition de ces deux nouvelles options thérapeutiques à l'imagerie moléculaire TEP et par conséquent au diagnostic des cancers du sein semble parfaitement envisageable (201). Il suffirait par exemple de radiomarquer le ZD1839 au fluor-18 à la

position actuelle de l'atome de fluor dans la molécule, ou d'insérer du cuivre-64 via le ligand bifonctionnel benzyl-TETA sur l'anticorps trastuzumab (70). Ces nouvelles sondes moléculaires radioactives devraient alors permettre d'évaluer *in vivo* l'efficacité de ces nouveaux traitements, mais également d'obtenir une meilleure compréhension moléculaire des voies entrelacées entre le récepteur d'œstrogène et les facteurs de croissance et ainsi fournir des indices pour la planification du traitement optimal et l'élaboration de nouvelles stratégies qui empêcheraient ou préviendraient de la résistance endocrine de certaines tumeurs du tissu mammaire.

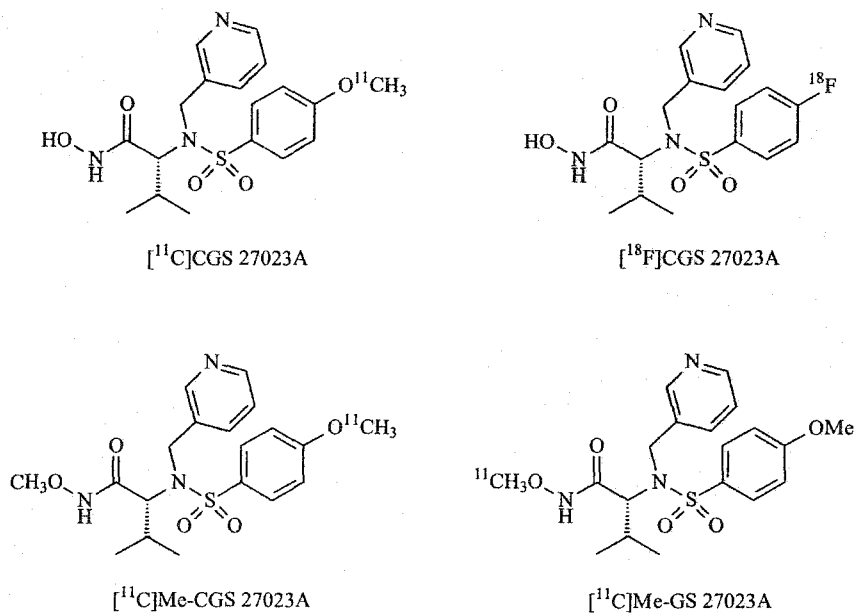
Une autre possibilité offerte pour la visualisation TEP des cancers du sein est de développer des radiotraceurs basés sur les inhibiteurs des métalloprotéinases de la matrice cellulaire (MMP). En effet, la récurrence et la valeur pronostique de la présence du RE dans les cancers du sein font de cette protéine une cible cellulaire idéale pour le diagnostic de cette maladie, mais de nombreuses autres molécules biologiques, telles que les MMP, sont également surexprimées dans les cellules tumorales du sein et peuvent par conséquent être considérées comme des cibles potentielles pour l'imagerie TEP (202). Les MMP sont une famille d'enzymes, structurellement reliées et présentes en fortes concentrations dans de nombreux types de tumeurs, qui sont responsables de la rupture de la matrice extracellulaire et donc associées au caractère métastatique de ces tumeurs. De nombreux inhibiteurs des MMP (notamment exprimées dans les cancers du sein) ont d'ores et déjà été identifiés et sont capables de réduire significativement la croissance et la prolifération des cellules tumorales chez l'animal (Figure 18, réf. 203, 204).

Cependant, puisque l'on s'interroge encore pour savoir quels sont les membres de la famille des MMP qui sont les plus importants dans le processus de l'invasion tumorale et lesquels représentent la meilleure cible pour les nouvelles thérapies, chacun de ces inhibiteurs a été développés pour présenter des propriétés pharmaco-cinétiques distinctes et interagir avec un ou plusieurs MMP en particulier. Ainsi, le radiomarquage avec un émetteur de positron de ces inhibiteurs devrait permettre de mesurer les concentrations des diverses MMP dans les cancers du sein et évaluer la réponse de ces tumeurs à ces

nouvelles thérapies. Plusieurs dérivés TEP du CGS 27023A marqués au carbone-11 ou au fluor-18 ont récemment été préparés (Figure 19, réf. 205).



**Figure 18.** Structures chimiques de quelques inhibiteurs de MMP actuellement en phase d'évaluation clinique pour le traitement des cancers



**Figure 19.** Structures chimiques des dérivés TEP de l'inhibiteur de MMP: CGS 27023A

Enfin, il est indéniable que la synergie actuelle entre l'imagerie nucléaire et la biologie moléculaire contribue à élucider progressivement les mécanismes impliqués dans la cancérogenèse du sein et ouvre par conséquent de nouvelles perspectives pour la prévention, le diagnostic, la caractérisation et le traitement des cancers du sein (206). Le récepteur d'œstrogène reste cependant une cible cellulaire idéale, principalement à cause de sa récurrence dans les lésions tumorales du tissu mammaire et la valeur prédictive que confère sa présence au clinicien. De plus, les succès cliniques des dérivés radiomarqués de l'estradiol et la découverte de nouveaux MSRE avec des profils agoniste/antagoniste très variés encouragent de nombreux investigateurs à rechercher des ligands possédant une meilleure affinité et une plus grande sélectivité vis à vis des RE. Toutefois, une meilleure compréhension de la pharmacologie des œstrogènes et des MSRE est inévitable pour pouvoir optimiser à l'avenir le design et le développement de nouveaux ligands des RE; et l'imagerie TEP en est vraisemblablement un des protagonistes.



## VII- Conclusion

---

En conclusion, le développement d'une méthode qui permettrait d'évaluer la fonctionnalité des récepteurs d'œstrogène semble être d'une importance clinique critique. La tomographie d'émission par positrons (TEP), associée à un radioligand émetteur de positron adéquat, peut alors être envisagée. En effet, la forte affinité des œstrogènes pour leurs récepteurs fournit un mécanisme idéal pour l'accumulation sélective de radiostéroïdes à l'intérieur des tumeurs RE-positives et donc offre une alternative qui posséderait plusieurs avantages par rapport au test *in vitro*. Les études expérimentales qui ont été menées avec le  $16\alpha$ -[ $^{18}\text{F}$ ]fluoroestradiol (FES), chez l'animal ou en clinique, ont en effet largement démontré la faisabilité de cette procédure. Cependant, le FES est métabolisé rapidement, ce qui empêche une localisation optimale de cet agent radiopharmaceutique au niveau des sites riches en RE, et perturbe probablement l'interprétation quantitative des images obtenues lors d'un examen TEP-FES.

Pour remédier au problème de métabolisme du FES, nous avons envisagé la synthèse de plusieurs dérivés substitués sur le cycle A par un fluor avec ou sans un groupement méthoxy en position  $11\beta$ . En effet, la présence d'un fluor en position 2 ou 4 est censée ralentir le métabolisme en bloquant la formation des œstrogènes catéchols tandis que l'introduction d'un groupe  $11\beta$ -méthoxy améliore en général notablement la sélectivité de liaison *in vivo* et diminue les biotransformations qui interviennent sur le cycle D. Une première voie synthétique a été élaborée pour pouvoir disposer rapidement d'échantillons non radioactifs analytiquement purs pour les études *in vitro*. Cette synthèse consiste principalement en l'introduction des deux atomes de fluor, respectivement sur le cycle D et A de l'estrone ou de la  $11\beta$ -méthoxyestrone, selon des substitutions électrophiles. Cependant, cette méthode n'est malheureusement pas appropriée à la préparation des analogues marqués au fluor-18 à cause de l'incompatibilité des temps nécessaires à compléter les différentes réactions et la courte demi-vie du F-18. Nous avons donc développé une autre route synthétique, via des intermédiaires sulfates  $16\beta,17\beta$ -cycliques,

qui permet une incorporation rapide et stéréosélective du [16 $\alpha$ -<sup>18</sup>F]-fluoro. Le marquage radioactif est réalisé en environ deux heures avec des rendements corrigés pour la décroissance de l'ordre de 30 à 50% et l'activité spécifique des agents radiopharmaceutiques a été estimée supérieure à 3000 Ci/mmol.

Les dérivés 2- et 4-fluoro du FES ont montré une diminution significative de la capture dans l'organe cible riche en RE, ainsi que des rapports utérus/sang et utérus/non-cibles par rapport au FES. Ce profil *in vivo* corrèle parfaitement avec leur comportement *in vitro*. Par contre, l'addition du 11 $\beta$ -méthoxy au FES résulte en un effet opposé, car malgré une baisse significative de l'affinité de liaison pour le RE, la capture utérine *in vivo* par l'intermédiaire des RE est augmentée de 16% et les paramètres de sélectivité de liaison respectivement de 63% et 23% pour les rapports utérus/sang et utérus/non-cibles. L'effet de la fluoration aromatique sur le métabolisme est évident de par les faibles captures observées dans le foie et les reins pour les dérivés 2- et 4-fluoro par rapport aux molécules parentes. La capture dans les os pour l'ensemble des traceurs est faible, ce qui indique l'absence de <sup>18</sup>F<sup>-</sup> libre et confirme la stabilité *in vivo* de la liaison C-F. Ainsi, pour la première série des dérivés du FES, le 4,16 $\alpha$ -[16 $\alpha$ -<sup>18</sup>F]difluoro-11 $\beta$ -méthoxyestradiol (4-F-M[<sup>18</sup>F]FES) a montré la plus forte capture dans le tissu cible riche en RE et une bonne stabilité *in vivo* (attestée par une faible capture par le foie, les reins et les os). Il promet d'être un bon candidat pour l'imagerie TEP des densités de RE dans les cancers du sein. Toutefois, sa faible affinité de liaison à la protéine SHBG pourrait affecter son potentiel comme agent d'imagerie nucléaire des RE. C'est pourquoi une biodistribution dans un modèle animal plus approprié ou des études cliniques devraient donner des informations plus concluantes sur le futur de ce produit. Cependant, étant donné ses bonnes propriétés de localisation et sa sélectivité de liaison, cet agent radiopharmaceutique a indéniablement de l'avenir pour valider le potentiel de nouvelles thérapies pour les tumeurs RE-positives chez l'animal.

Le ICI 182,780 est un antagoniste de l'œstrogène qui est actuellement en phase clinique en vue d'une utilisation pour le traitement endocrinien du cancer du sein. L'avantage principal de ce composé est sa capacité à combattre les tumeurs RE(+) qui sont devenues

résistantes au tamoxifène, l'antioestrogène le plus utilisé dans les régimes thérapeutiques hormonaux. Nous avons donc envisagé de développer trois dérivés mimétiques du ICI 182,780 dédiés à l'imagerie TEP des RE. Chacun des dérivés correspond à un degré d'oxydation différent de l'atome de soufre (sulfure, sulphonyl = ICI 182,780 et sulphone). La position du fluor radioactif a été conservée à la position  $16\alpha$ , en parallèle au FES qui demeure la référence clinique. La stratégie synthétique consiste à réaliser une réaction de Grignard entre un organomagnésien et un stéroïde 4,6-dièn-3-one. Cependant, cette méthode n'est pas stéréosélective et mène au mélange des épimères  $7\alpha/\beta$  qui doivent être ultérieurement séparés par chromatographie. De surcroît, cette approche impose l'aromatisation du cycle A pour recouvrer la structure de l'oestrogène. L'objectif des quatre étapes suivantes est de préparer le diol vicinal qui sera à la fin de la synthèse converti en des précurseurs sulfates  $16\beta,17\beta$ -cycliques sur lesquels la fluoration nucléophile sera conduite. Une fois le diol obtenu, quatre étapes sont nécessaires pour achever le substituant à la position  $7\alpha$  et ainsi obtenir une chaîne latérale parente de celle du ICI 182,780, mais à un état d'oxydation plus bas du soufre, sulfure au lieu de sulfoxyde. Une oxydation sélective du sulfure en sulfoxyde ou sulphone permet d'obtenir les deux autres dérivés  $16\beta,17\beta$ -diols. Les trois diols vicinaux sont par la suite convertis en intermédiaires sulfates  $16\beta,17\beta$ -cycliques par traitement des diols avec l'hydrure de sodium et le sulfonyldiimidazole. Ces intermédiaires cycliques sont finalement stéréosélectivement ouverts à la position  $16\alpha$  dans des conditions anhydres via une fluoration nucléophile avec le  $\text{Me}_4\text{NF}$  et l'hydrolyse des groupements protecteurs MOM et sulfate conduit aux trois dérivés mimétiques du ICI 182,780 fluorés à la position  $16\alpha$ . Cette procédure est rapidement adaptée pour le radiomarquage avec le fluor-18 en substituant le  $\text{Me}_4\text{NF}$  par le  $^{18}\text{F}^-$ , et l'évaluation biologique de ces nouveaux agents radiopharmaceutiques est actuellement en cours.

## **VIII- Annexes**

---

**Annexe I.** Modèle du procédé d'activation du RE.

**Annexe II.** Représentation du RE $\alpha$ -LBD.

**Annexe III.** Mode d'interaction de E<sub>2</sub> avec le RE-LBD.

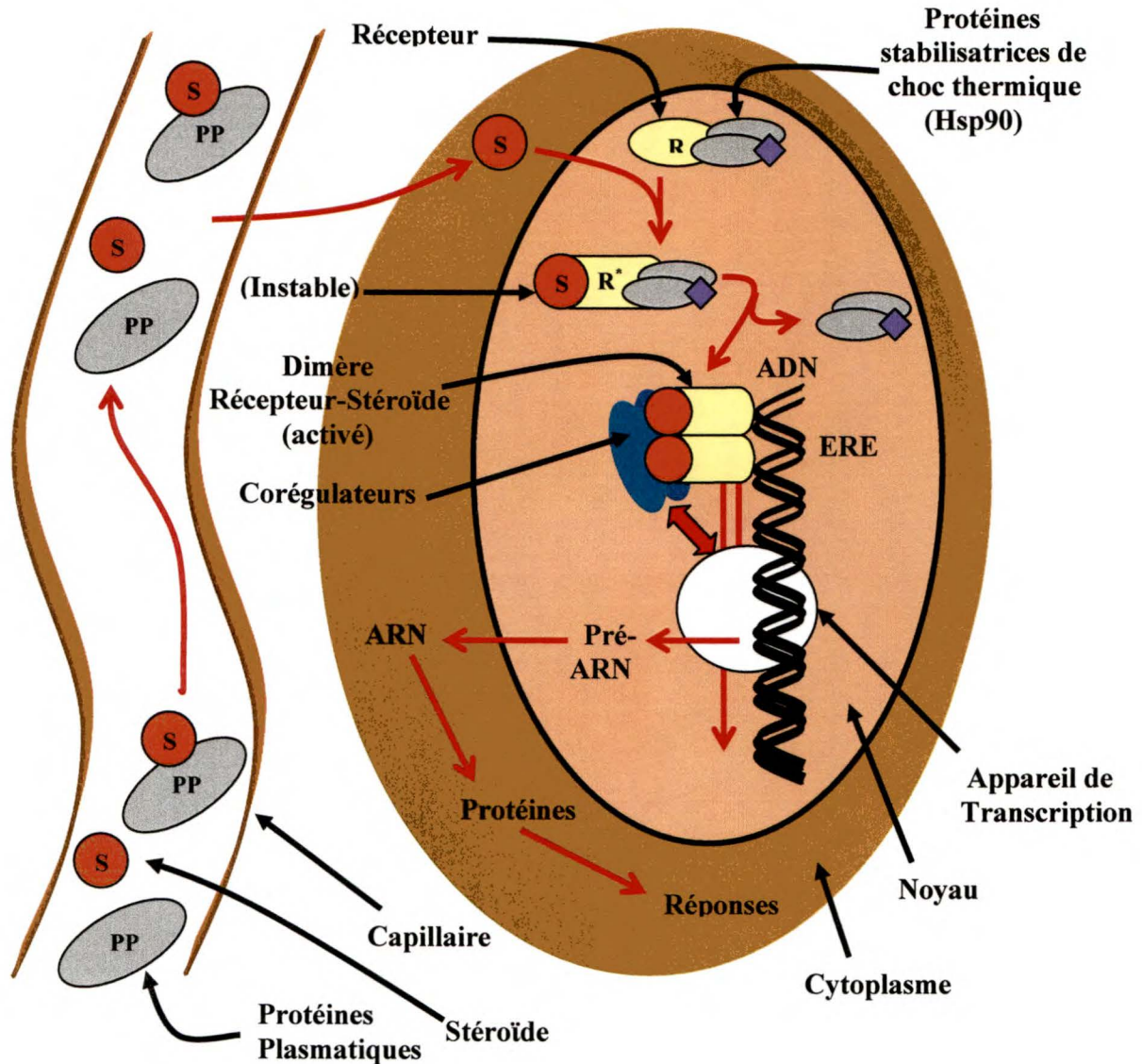
**Annexe IV.** Structure du RE-LBD avec les ligands E<sub>2</sub> et raloxifène.

**Annexe V.** Modélisation moléculaire du RE $\alpha$

**Annexe VI.** Schéma de la cible du CIMF pour la production de fluor-18.

**Annexe VII.** Schéma du module de synthèse.

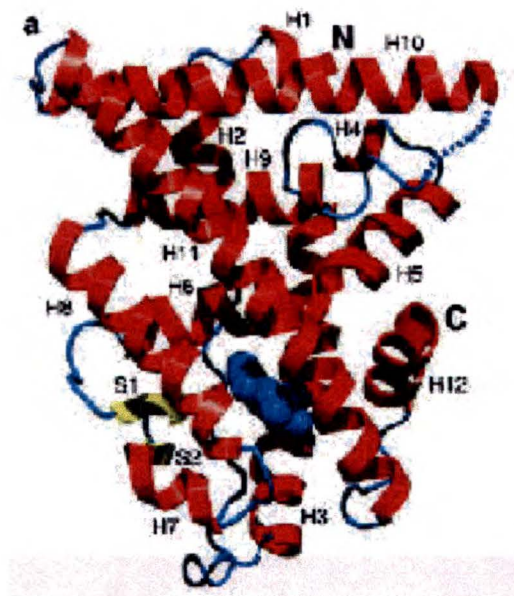
## Annexe I.



**Annexe I.** Modèle du procédé d'activation du RE. Le ligand estradiol (S), induit un changement de conformation du récepteur et la transcription des gènes dépendants en estrogène. Le RE lié à l'estradiol se lie à l'élément de réponse estrogénique (ERE) dans le promoteur des gènes cibles et recrute les protéines co-régulatrices qui servent de pont physique entre le récepteur et l'unité de transcription.

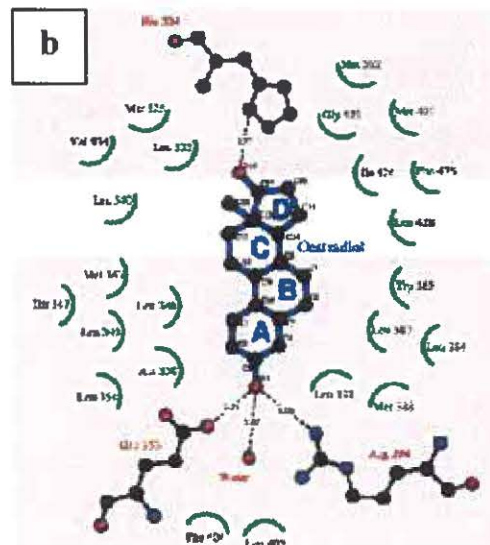
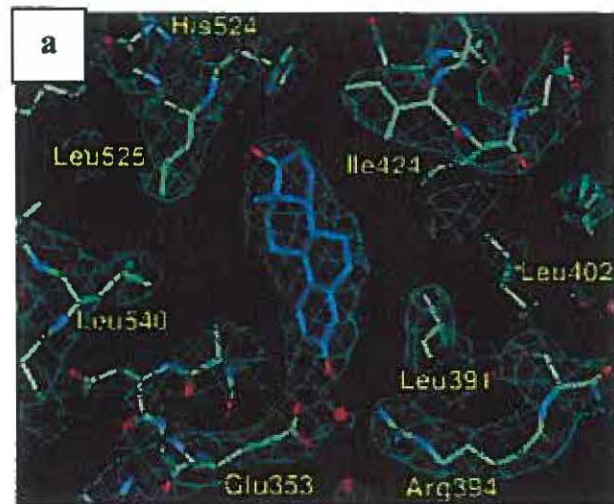
## *Annexe II.*

---



**Annexe II.** Représentation du RE $\alpha$ -LBD. Les différentes hélices (H) sont de couleur rouge et la forme en bleu représente la molécule de E<sub>2</sub> à l'intérieur du LBD. (Brzozowski A. M. et al. *Nature*. (1997) 389, 753-758).

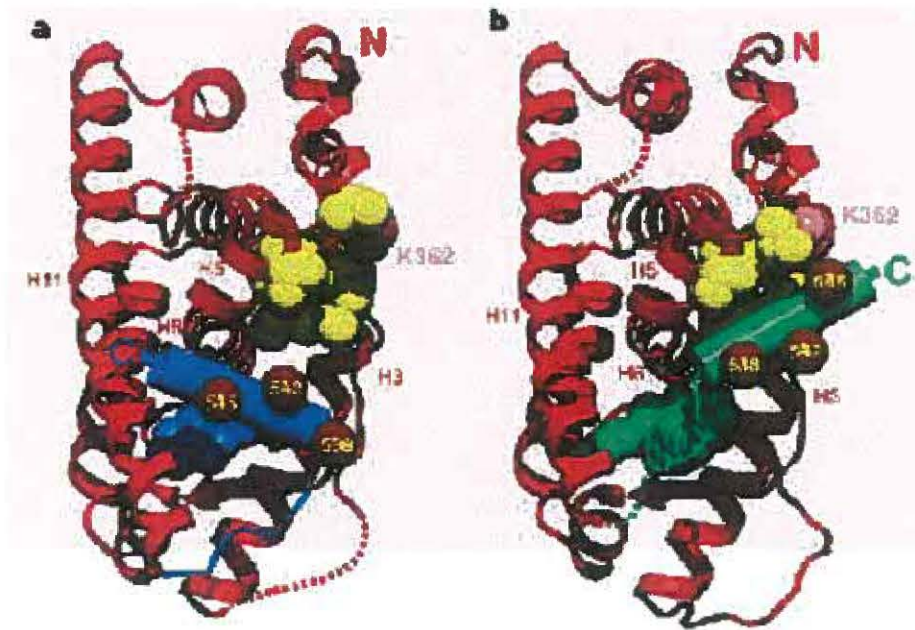
## Annexe III.



**Annexe III.** Mode d'interaction de l'agoniste E<sub>2</sub> avec le LBD de son récepteur. **a**, représentation de la densité électronique du complexe RE LBD-E<sub>2</sub> à une résolution de 3.1 Å. **b**, Représentation schématique des interactions de E<sub>2</sub> à l'intérieur de la cavité de liaison. (Brzozowski A. M. et al. *Nature*. (1997) 389, 753-758).

## *Annexe IV.*

---

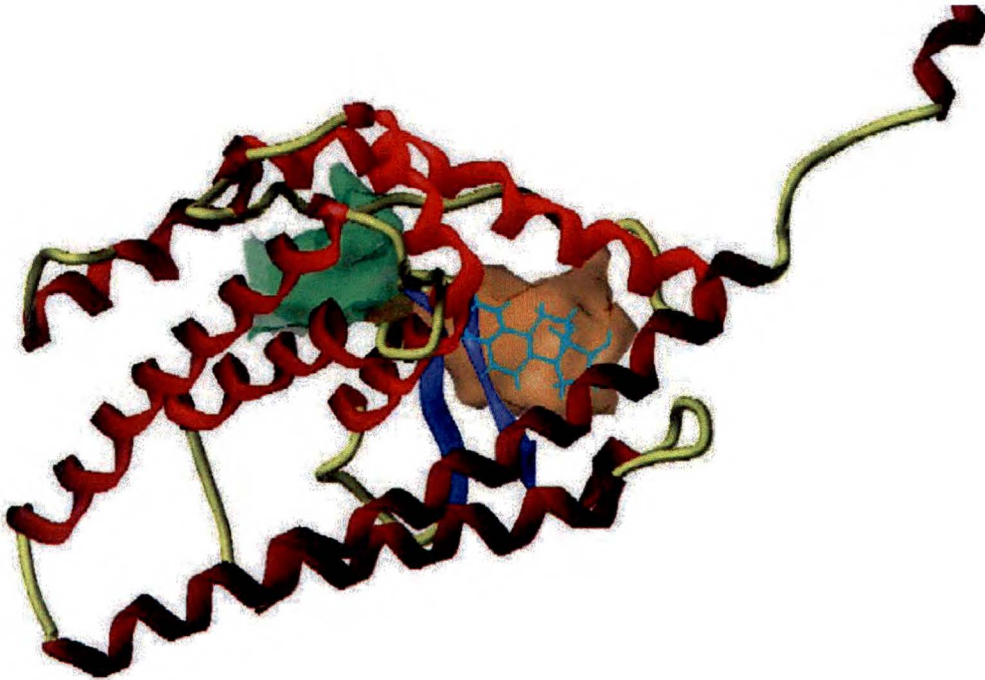


**Annexe IV.** Différence structurelle du RE-LBD avec les ligands E<sub>2</sub> et raloxifène. **a**, le complexe RE LBD-E<sub>2</sub>. **b**, le complexe RE LBD-RAL. (Brzozowski A. M. et al. *Nature*. (1997) 389, 753-758).



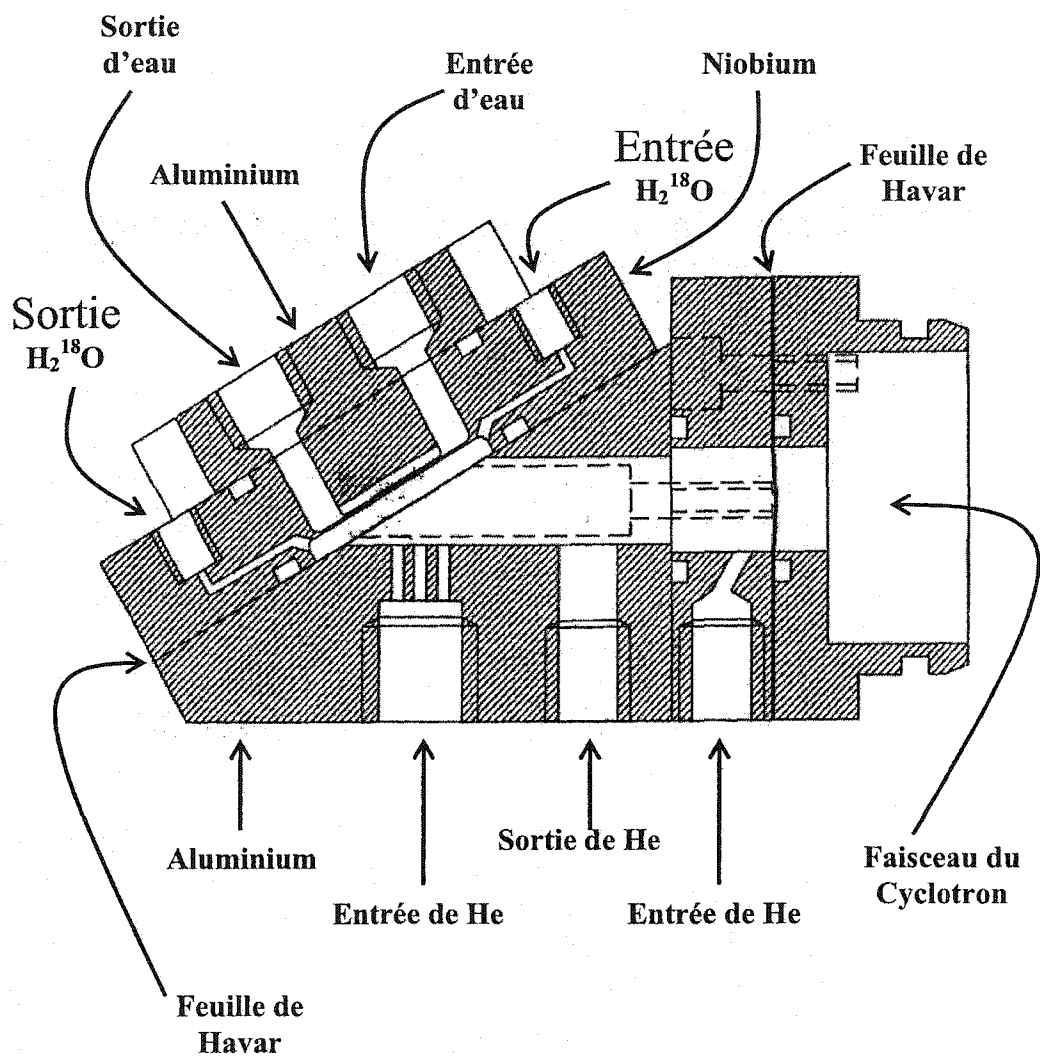
## *Annexe V.*

---



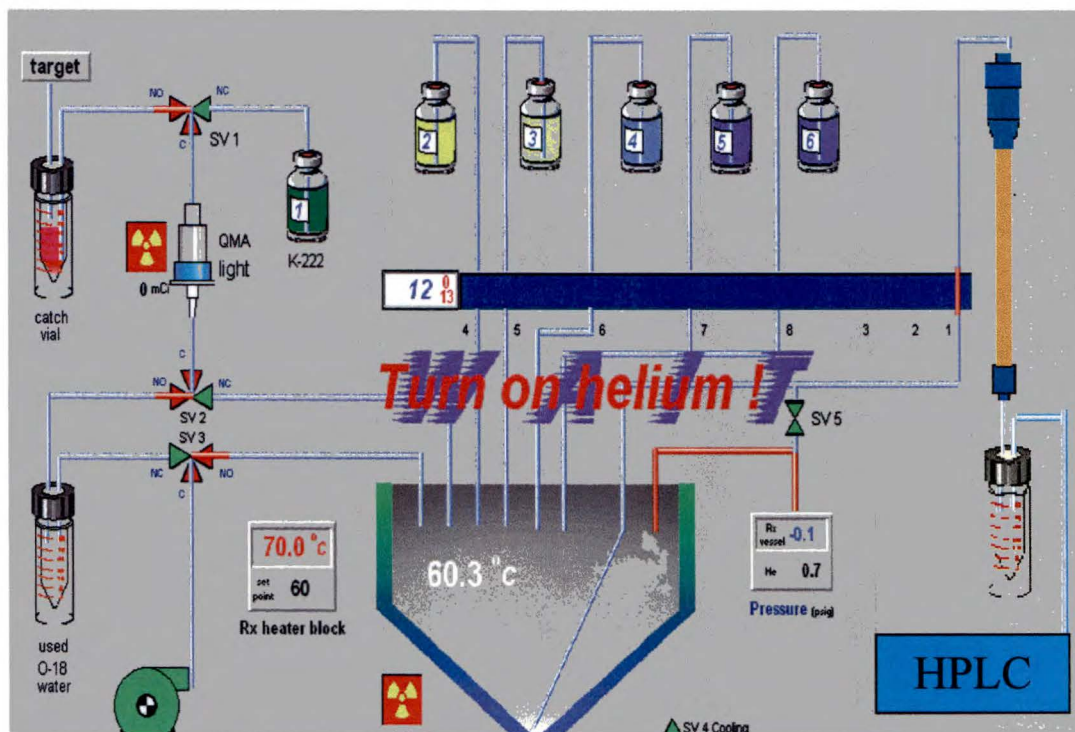
**Annexe V.** Modélisation moléculaire du récepteur d'estrogène (RE $\alpha$ ). En rouge sont représentés les différentes helices du LBD, la poche en vert est l'endroit par lequel le ligand entre dans le récepteur, et l'espace en orange est la cavité de liaison du récepteur.

## Annexe VI.



Annexe VI. Schéma de la cible du CIMF pour la production de fluorure-18 à partir d'eau enrichie en oxygène-18.

## Annexe VII.



Annexe VII. Schéma du module de synthèse.

# Références bibliographiques

---

1. Institut National du cancer du Canada, Statistiques canadiennes sur le cancer, Toronto, Ontario (1999).
2. Kelsey J. L., Bernstein L. Epidemiology and prevention of breast cancer. *Ann. Rev. Public Health.* **17**, 47-67 (1996).
3. Easton D. F., Bishop D. T., Ford D., Crockford G. P., et al. Genetic linkage in familial breast and ovarian cancer: Results from 214 families. *Am. J. Hum. Genet.* **52**, 678-701 (1993).
4. Brody L. C., Biesecker B. B. Breast cancer susceptibility genes, BRCA1 and BRCA2. *Medicine.* **77**, 208-226 (1998).
5. Fisher B., Costantino J. P., Wickerham D. L., Redmond C. K., Kavanah M., Cronin W. M., et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer : report of the national surgical adjuvant breast and bowel project P-1 study. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 1371-1388 (1998).
6. Cummings S. R., Eckert S., Krueger K. A., Grady D., Powles T. J., Cauley J. A., Norton L., Nickelsen T., Bjarnason N. H., Morrow M., Lippman M. E., Black D., Glusman J. E., Costa A., Jordan V. C. The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women : results from the more randomized trial. Multiple outcomes of raloxifene evaluation. *J.A.M.A.* **281**, 2189-2197 (1999).
7. Mc Guire W. L. Hormone receptors : Their role in predicting prognosis and response to endocrine therapy. *Semin. Oncol.* **5**, 428-433 (1978).
8. Jordan V. C. Designer estrogens. *Scientific American.* **10**, 60-67 (1998).
9. Mora S., Kershner D. W., Vigilance C. P., Blumenthal R. S. Coronary artery disease in postmenopausal women. *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.* **2**, 345-352 (2001).
10. Turner R. T., Riggs B. L., Spelsberg T. C. Skeletal effects of estrogen. *Endocrine Rev.* **15**, 275-300 (1994).
11. Diel P., Olf S., Schmidt S., Michna H. Effects of the environmental estrogens bisphenol A, o,p'-DDT, p-tert-octylphenol and coumestrol on apoptosis induction,

- cell proliferation and the expression of estrogen sensitive molecular parameters in the human breast cancer cell line MCF-7. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **80**, 61-70 (2002).
12. Andersen H. R., Vinggaard A. M., Rasmussen T. H., Gjermansen I. M., Bonfeld-Jorgensen E. C. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **179**, 1-12 (2002).
  13. Adlercreutz H. Phyto-oestrogens and cancer. *Lancet Oncol.* **3**, 364-373 (2002).
  14. Love R. R., Mazess R. B., Barden H. S., Epstein S., Newcomb P. A., Jordan V. C., Carbone P. P., DeMets D. L. Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer. *New Engl. J. Med.* **326**, 852-856 (1992).
  15. Lacey J. V. Jr., Mink P. J., Lubin J. H., Sherman M. E., Troisi R., Hartge P., Schatzkin A., Schairer C. Menopausal hormone replacement therapy and risk of ovarian cancer. *JAMA.* **288**, 334-341 (2002).
  16. Newcomb P. A., Titus-Ernstoff L., Egan K. M., Trentham-Dietz A., Baron J. A., Storer B. E., Willett W. C., Stampfer M. J. Postmenopausal estrogen and progestin use in relation to breast cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **11**, 593-600 (2002).
  17. Buzdar A. U. Endocrine therapy in the treatment of metastatic breast cancer. *Semin. Oncol.* **28**, 291-304 (2001).
  18. Van de Velde P., Nique F., Bouchoux F., Brémaud J., Hameau M. C., Lucas D., Moratille C., Viet S., Philibert D., Teutsch G. RU 58 668, anew pure antiestrogen inducing a regression of human mammary carcinoma implanted in nude mice. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **48**, 187-196 (1994).
  19. Nique F., Van de Velde P., Brémaud J., Hardy M., Philibert D., Teutsch G. 11 $\beta$ -Amidoalkoxyphenyl estradiols, anew series of pure antiestrogens. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **50**, 21-29 (1994).
  20. Bowler J., Lilley T. J., Pittam J. D., Wakeling, A. E. Novel steroidal pure antiestrogens. *Steroids.* **54**, 71-99 (1989).
  21. Bowler J., Tait B. S. *European Patent Application.* **EP 138 504** (1984).

22. Miller C. P. SERMs: Evolutionary Chemistry, Revolutionary Biology. *Curr. Pharm. Des.* **8**, 2089-2111 (2002).
23. Delmas P. D. Treatment of postmenopausal osteoporosis. *Lancet.* **359**, 2018-2026 (2002).
24. Kuiper G. G. J. M., Enmark E., Pelto-Huikko M., Nilsson S., Gustafsson J. A. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 5925-5930 (1996).
25. Mosselman S., Polman J., Dijkema R. ER $\beta$ : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Letters.* **392**, 49-53 (1996).
26. Roger P., Sahla M. E., Makela S., Gustafsson J. A., Baldet P., Rochefort H. Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res.* **61**, 2537-2541 (2001).
27. Tsai M. J., O'Malley B. W. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 451-486 (1994).
28. Kumar V., Chambon P. The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell.* **55**, 145-156 (1988).
29. Katzenellenbogen J. A., O'Malley B. W., Katzenellenbogen B. S. Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: Interaction with multiple effector sites as a basis for the cell- and promoter- specific action of these hormones. *Mol. Endocrinol.* **10**, 119-131 (1996).
30. Beato M., Sanchez-Pacheco A. Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocr. Rev.* **17**, 587-609 (1996).
31. Tzukerman M. T., Esty A., Santiso-Mere D., Danielian P., Parker M. G., Stein R. B., Pike J. W., McDonnell D. P. Human estrogen receptor transcriptional capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol. Endocrinol.* **8**, 21-30 (1994).
32. Wurtz J. M., et al. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nature Struct. Biol.* **3**, 87-94 (1996).
33. Moras D., Gronemeyer H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Cur. Opin. Cell Biol.* **10**, 384-391 (1998).

34. Brzozowski A. M., Pike A. C., Dauter Z., Hubbard R. E., Bonn T., Engström O., Öhman L., Greene G. L., Gustafsson J. A., Carlquist M. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*. **389**, 753-758 (1997).
35. Anstead G. M., Carlson K. E., Katzenellenbogen J. A. The estradiol pharmacophore: Ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids*. **62**, 268-303 (1997).
36. Andrews P. R., Craik D. J., Martin J. L. Functional group contributions to drug-receptor interactions. *J. Med. Chem.* **27**, 1648-1657 (1984).
37. Wiese T. E., Brooks S. C. Molecular modeling of steroidal estrogens: Novel conformations and their role in biological activity. *J. Steroid Biochem. Molec. Bio.* **50**, 61-73 (1994).
38. Webb P., Lopez G. N., Uht R. M., Kushner P. J. Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol. Endocrinol.* **9**, 443-456 (1995).
39. Porter W., Saville B., Hoivik D., Safe S. Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. *Mol. Endocrinol.* **11**, 1569-1580 (1997).
40. Lonard D. M., Smith C. L. Molecular perspectives on selective estrogen receptor modulators (SERMs): progress in understanding their tissue-specific agonist and antagonist actions. *Steroids*. **67**, 15-24 (2002).
41. McDonnell D. P., Clemm D. L., Hermann T., Goldman M. E., Pike J. W. Analysis of estrogen receptor function in vitro reveals three distinct classes of antiestrogens. *Mol. Endocrinol.* **9**, 659-669 (1995).
42. Danielian P. S., White R., Lees J. A., Parker M. G. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J.* **11**, 1025-33 (1992).
43. McDonnell D. P. Definition of the molecular mechanism of action of tissue-selective oestrogen-receptor modulators. *Biochem. Soc. Trans.* **26**, 54-60 (1997).
44. Paech K., Webb P., Kuiper G. G., Nilsson S., Gustafsson J., Kushner P. J., Scanlan T. S. Differential ligand activation of estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$  at AP1 sites. *Science*. **277**, 1222-1224 (1997).

45. Johnston S. R. D. Endocrine manipulation in advanced breast cancer: recent advances with SERM therapies. *Clin. Cancer Res.* **7**, 4376s-4387s (2001).
46. Smith C. L., Nawaz Z., O'Malley B. W. Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol. Endocrinol.* **11**, 657-666 (1997).
47. Lavinsky R. M., Jepsen K., Heinzl T., Torchia J., Mullen T. M., Schiff R., Del-Rio A. L., Ricote M., Ngo S., Gemsch J., Hilsenbeck S. G., Osborne C. K., Glass C. K., Rosenfeld M. G., Rose D. W. Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 2920-2925 (1998).
48. Geisler J., Lonning P. E. Resistance to endocrine therapy of breast cancer: recent advances and tomorrow's challenges. *Clin. Breast Cancer.* **1**, 297-308 (2001).
49. Dauvois S., Daniellan P. S., White R., Parker M. G. Antiestrogen ICI 164,384 reduces cellular estrogen content by increasing its turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 4037-4041 (1992).
50. Parker M. G. Action of pure antiestrogens in inhibiting estrogen receptor function. *Breast Cancer Res. Treat.* **26**, 131-137 (1993).
51. Dickson R. B., Lippman M. E. Control of human breast cancer by estrogen, growth factors and oncogenes. In Lippman M. E., Dickson R. B. (eds). *Breast Cancer: Cellular and Molecular Biology. Kluwer, Boston 1988 ; 119-65.*
52. Philips A., Chalbos D., Rochefort H. Estradiol increases and antiestrogens antagonize the growth factor-induced activator protein-1 activity in MCF7 breast cancer cells, without affecting c-fos and c-jun synthesis. *J. Biol. Chem.* **268**, 14103-14108 (1993).
53. Liehr J. G. Modulation of estrogen-induced carcinogenesis by chemical modification. *Arch. Toxicol.* **55**, 119-122 (1984).
54. Liehr J. G., Hall E. R., Avitts T. A., Randerath E., Randerath K. Localisation of estrogen-induced DNA adducts and cytochrome P-450 activity at the site of renal carcinogenesis in the hamster kidney. *Cancer Res.* **41**, 2156-2159 (1987).
55. Yager J. D., Liehr J. G. Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**, 203-232 (1996).



56. Anzick S. L., Kononen J., Walker R. L., Azorsa D. O., Tanner N. M., Guan X. Y., Sauter G., Kallioniemi O. P., Trent J. M., Meltzer P. S. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science*. **277**, 965-968 (1997).
57. Murphy L. C., Simon S. L., Parkes A., Leygue E., Dotzlaw H., Snell L., Troup S., Adeyinka A., Watson P. H. Altered expression of estrogen receptor coregulators during human breast tumorigenesis. *Cancer Res*. **60**, 6266-6271 (2000).
58. McGuire W. L., Horwitz K. B., Pearson O. H., Segaloff A. Current status of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Cancer*. **39**, 2934-2947 (1977).
59. Campbell F. C., Blamey R. W., Elston C. W., Morris A. H., Nicholson R. I., Griffiths K., Haybittle J. L. Quantitative oestradiol receptor values in primary breast cancer and response of metastases to endocrine therapy. *Lancet*. **2**, 1317-1319 (1981).
60. Bertelsen C. A., Guiliano A. E., Kern D. H., Mann B. D., Roe D. J., Morton D. L. Breast cancers: Estrogen and progesterone receptor status as a predictor of in vitro chemotherapeutic response. *J. Surgical Res*. **37**, 257-263 (1984).
61. Vollenweider-Zerargui L., Barrelet L., Wong Y., Lemarchand-Béraud T., Gomez F. The predictive value of estrogen and progesterone receptors' concentrations on the clinical behavior of breast cancer in women: clinical correlation on 547 patients. *Cancer*. **57**, 1171-1180 (1986).
62. Thorpe S. M., Rose C., Rasmussen B. B., et al. Steroid hormone receptors as prognostic indicators in primary breast cancer. *Br. Cancer Res. Treat*. **7**, 91-98 (1986).
63. Rio M. C., Chambon P. The pS2 gene, mRNA and protein: a potential marker for human breast cancer. *Cancer Cells*. **2**, 269-274 (1990).
64. Rochefort H., Capony F., Garcia M. Cathepsin D in breast cancer : From molecular and cellular biology to clinical applications. *Cancer Cells*. **2**, 383-388 (1990).
65. Phelps M. E. Inaugural article: Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 9226-9233 (2000).
66. Volkow N. D., Rosen B., Farde L. Imaging the living human brain: Magnetic resonance imaging and positron emission tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**, 2787-2788 (1997).

67. Langstrom B., Bergstrom M., Hartvig P., Valind S., Watanabe Y. Is PET a tool for drug evaluation? In: *PET for Drug Development and Evaluation*. 26. Comar D. ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands (1995).
68. Rigo P., Paulus P., Kaschten B. J., Hustinx R., Bury T., Jerusalem G., Benoit T., Foidart-Willems J. Oncological applications of positron emission tomography with fluorine-18 fluorodeoxyglucose. *Eur. J. Nucl. Med.* **23**, 1641-1674 (1996).
69. Tewson T. J., Krohn K. A. PET radiopharmaceuticals: State-of-the-art and future prospects. *Sem. Nuc. Med.* **28**, 221-234 (1998).
70. Wu A. M., Yazaki P. J., Tsai S. W., Nguyen K., Anderson A. L., McCarthy D. W., Welch M. J., Shively J. E., Williams L. E., Raubitschek A. A., Wong J. Y. C., Toyokuni T., Phelps M. E., Gambhir S. S. High-resolution microPET imaging of carcinoembryonic antigen-positive xenografts by using a copper-64-labeled engineered antibody fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 8495-8500 (2000).
71. Park B. K., Kitteringham N. R., O'Neill P. M. Metabolism of fluorine-containing drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**, 443-470 (2001).
72. Welch J. T. Advances in the preparation of biologically active organofluorine compounds. *Tetrahedron.* **43**, 3123 (1987).
73. Ido T., Wan C. N., Casella V., Fowler J. S., Wolf A. P. J. Fluorination with F<sub>2</sub>. A convenient synthesis of 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. *J. Org. Chem.* **42**, 2341-2342 (1977).
74. Varagnolo L., Stokkel M. P. M., Mazzi U., Pauwels E. K. J. <sup>18</sup>F-labeled radiopharmaceuticals for PET in Oncology, excluding FDG. *Nucl. Med. Biol.* **27**, 103-112 (2000).
75. Stöcklin G. Is there a future for clinical fluorine-18 radiopharmaceuticals (excluding FDG)? *Eur. J. Nucl. Med.* **25**, 1612-1616 (1998).
76. Guillaume M., Luxen A., Nebeling B., Argentini M., Clark J. C., Pike V. W. Recommendations for fluorine-18 production. *Appl. Radiat. Isot.* **42**, 749 (1991).
77. Kilbourn M. R., Hood J. T., Welch M. J. A simple <sup>18</sup>O water target for <sup>18</sup>F production. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **35**, 599 (1984).

78. Wieland B. W., Hendry G. O., Schmidt D. G., Bida G., Ruth T. J. Efficient small volume O-18 water targets for producing F-18 fluoride with low energy protons (abs). *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **23**, 1205 (1986).
79. Suehiro M., Nozaki T., Sasaki T., Suzuki H., Senda M., Toyama H., Ishii S. I. A practical production of NCA  $^{18}\text{F}$  from natural water via the  $^{16}\text{O}(^3\text{He,p})^{18}\text{F}$  reaction, using an ultra-compact in-house cyclotron. *Appl. Radiat. Isot.* **42**, 1231 (1991).
80. Clark J. C., Silvester D. J. A cyclotron method for the production of fluorine-18. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **17**, 151 (1966).
81. Ruiz H. V. Report of an International Atomic Energy Agency's consultants' meeting on fluorine-18: Reactor production and utilization. *Appl. Radiat. Isot.* **39**, 31 (1988).
82. Blessing G., Coenen H. H., Franken K., Qaim S. M. Production of  $^{18}\text{F}[\text{F}]_2$ ,  $\text{H}^{18}\text{F}$ ,  $^{18}\text{F}^{-\text{aq}}$  using the  $^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$  process. *Appl. Radiat. Isot.* **37**, 1135 (1986).
83. Katzenellenbogen J. A., Heiman D. F., Carlson K. E., Lloyd J. E. In vivo and in vitro steroid receptor assays in the design of estrogen radiopharmaceuticals. In: *Receptor-binding radiotracers*. 93(I). Eckelman W. C. ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, USA (1987).
84. Schlyer D. J., Bastos M. A. V., Alexoff D., Wolf A. P. Separation of [ $^{18}\text{F}$ ]fluoride from [ $^{18}\text{O}$ ]water using anion exchange resin. *Appl. Radiat. Isot.* **41**, 531 (1990).
85. Irie T., Fukushi K., Ido T., Nozaki T., Kasida Y. [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorination by crown ether-metal fluoride: (I) On labeling  $^{18}\text{F}$ -21-fluoroprogesterone. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **33**, 1449 (1982).
86. Hamacher K., Coenen H. H., Stöcklin G. Efficient stereospecific synthesis of no carrier added 2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoro-2-deoxy-D-glucose using aminopolyether supported nucleophilic substitution. *J. Nucl. Med.* **27**, 235 (1986).
87. Kiesewetter D. O., Kilbourn M. R., Landvatter S. W., Heiman D. F., Katzenellenbogen J. A., Welch M. J. Preparation of four fluorine-18-labeled estrogens and their selective uptakes in target tissues of immature rats. *J. Nucl. Med.* **25**, 1212 (1984).
88. Brodack J. W., Kilbourn M. R., Welch M. J., Katzenellenbogen J. A. NCA  $16\alpha$ -[ $^{18}\text{F}$ ]fluoroestradiol- $17\beta$ : The effect of reaction vessel on fluorine-18 resolubilisation, product yield, and effective specific activity. *Appl. Radiat. Isot.* **37**, 217-221 (1986).

89. Eckelman W. C., Reba R. C., Gibson R. E., Rzeszotarski W. J., Vieras F., Mazaitis J. K., Francis B. Receptor-binding radiotracers: A class of potential radiopharmaceuticals. *J. Nucl. Med.* **20**, 350-357 (1979).
90. Eckelman W. C. The application of receptor theory to receptor-binding and enzyme-binding oncologic radiopharmaceuticals. *Nucl. Med. Biol.* **21**, 759-769 (1994).
91. Howell A., Harland R. N. L., Barnes D. M., et al. Endocrine therapy for advanced carcinoma of the breast: relationship between the effect of tamoxifen upon concentrations of progesterone receptor and subsequent response to treatment. *Cancer Res.* **47**, 300-304 (1987).
92. Noguchi S., Miyauchi K., Nishizawa Y., Koyama H. Induction of progesterone receptor with tamoxifen in human breast cancer with special reference to its behavior over time. *Cancer.* **61**, 1345-1349 (1988).
93. Pomper M. G., Katzenellenbogen J. A., Welch M. J., Brodack J. W., Mathias C. J. Synthesis and target tissue selective uptake of a progestin receptor-based radiotracer for positron emission tomography. *J. Med. Chem.* **31**, 1360-1363 (1988).
94. Pomper M. G., Pinney K. G., Carlson K. E., et al. Target tissue uptake selectivity of three fluorine-substituted progestins: potential imaging agents for receptor-positive breast tumors. *Nucl. Med. Biol.* **17**, 309-319 (1990).
95. Verhagen A., Elsinga P. H., de Groot T.J., Paans A. M. J., de Goeji C. G. J., Sluysers M., Vaalburg W. A fluorine-18-labeled progestin as an imaging agent for progestin receptor-positive tumors with positron emission tomography. *Cancer Res.* **51**, 1930 (1991).
96. Dehdashti F., McGuire A. H., Vanbroeklin H. F., et al. Assessment of 21-<sup>[18F]</sup>fluoro-16 $\alpha$ -ethyl-19-norprogesterone as a positron-emitting radiopharmaceutical for detection of progestin receptors in human breast carcinomas. *J. Nucl. Med.* **32**, 1532-1537 (1991).
97. Verhagen A., Studeny M., Luurstsema G., et al. Metabolism of a [<sup>18</sup>F]fluorine labeled progestin (21-<sup>[18F]</sup>fluoro-16 $\alpha$ -ethyl-19-norprogesterone) in humans: a clue for future investigations. *Nucl. Med. Biol.* **21**, 941-952 (1994).

98. Harris J. R., Morrow M., Bonadonna G. Cancer of the breast. In: Devita V. T. Jr., Hellman S., Rosenberg S. A., (eds). *Cancer: principles and practice of oncology*. 4<sup>th</sup> Ed. Philadelphia, PA: Lippincott; 1993, pp 1264-1332.
99. Sheikh M. S., Garcia M., Pujol P., Fontana J. A., Rochefort H. Why are estrogen-receptor-negative breast cancers more aggressive than the estrogen-receptor-positive breast cancers ? *Invasion Metastasis*. **14**, 329-336 (1994).
100. Maudelonde T., Pujol P., Rochefort H. Récepteur des estrogènes et cancer du sein. *Rev. Prat.* **44**, 1299-1303 (1994).
101. Thorpe S. M., Rose C. Oestrogen and progesterone receptor determination in breast cancer: Technology and biology. *Cancer Sur.* **5**, 505-525 (1986).
102. Van Netten J. P., Armstrong J. B., Carlyle S. S., Goodchild N. L., Thornton I. G., Brigden M. L., Coy P., Fletcher C. Estrogen receptor distribution in the peripheral, intermediate and central regions of breast cancers. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **24**, 1885-1889 (1988).
103. Cummins C. H. Radiolabeled steroidal estrogens in cancer research. *Steroids*. **58**, 245-259 (1993).
104. Katzenellenbogen J. A. Designing steroid receptor-based radiotracers to image breast and prostate tumors. *J. Nucl. Med.* **36**, 8S-13S (1995).
105. Katzenellenbogen J. A. The pharmacology of steroid radiopharmaceuticals: Specific and nonspecific binding and uptake selectivity. In: Nunn A. D., ed. *Radiopharmaceuticals: chemistry and pharmacology*. New York: Marcel Dekker. 297-331 (1992).
106. Olea-Serrano N., Devleeschouwer N., Leclercq G., Heuson J. C. Assay for estrogen and progesterone Receptors of breast cancer cell lines in monolayer culture. *Eur. J. Cancer. Clin. Oncol.* **21**, 965-973 (1985).
107. Minick D. J., Frenz J. H., Patrick M. A., Brent D. A. A comprehensive method for determining hydrophobicity constants by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Med. Chem.* **31**, 1923-1933 (1988).
108. McElvany K. D., Carlson K. E., Katzenellenbogen J. A., Welch M. J. Factors affecting the target site uptake selectivity of estrogen radiopharmaceuticals: serum binding and endogenous estrogens. *J. Steroid Biochem.* **18**, 635-641 (1983).

109. McElvany K. D., Carlson K. E., Katzenellenbogen J. A., Welch M. J. Factors affecting the target site uptake selectivity of estrogen radiopharmaceuticals: serum binding and endogenous estrogens. *J. Steroid Biochem.* **18**, 635-641 (1983).
110. Mendel C. M. The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr. Rev.* **10**, 232-274 (1989).
111. Strel'chyonok O. A., Avvakumov G. V. Specific steroid-binding glycoproteins of human blood plasma: novel data on their structure and function. *J. Steroid Biochem.* **35**, 519-534 (1990).
112. Hryb D. J., Khan M. S., Romas N. A., Rosner W. The control of the interaction of sex hormone-binding globulin with its receptor by steroid hormones. *J. Biol. Chem.* **265**, 6048-6054 (1990).
113. Hanson R. N. The influence of structure modification on the metabolic transformations of radiolabeled estrogen derivatives. In: Nunn A. D., ed. *Radiopharmaceuticals: chemistry and pharmacology*. New York: Marcel Dekker. 333-364 (1992).
114. Shani J., Gazit A., Livshitz T., Biran S. Synthesis and receptor-binding affinity of fluorotamoxifen: a possible estrogen-receptor imaging agent. *J. Med. Chem.* **28**, 1504-1511 (1985).
115. Yang D. J., Tewson T., Tansey W., Kuang L. R., Reger G., Cherif A., Wright K. C., Moulton R. G., Tilbury R. S., Chu K., Kim E. E., Wallace S. Halogenated analogues of tamoxifen: Synthesis, receptor assay, and inhibition of MCF7 cells. *J. Pharm. Sci.* **81**, 622-625 (1992).
116. Yang D. J., Li C., Kuang L. R., Price J. E., Buzdar A. U., Tansey W., Cherif A., Gretzer M., Kim E. E., Wallace S. Imaging, biodistribution and therapy potential of halogenated tamoxifen analogues. *Life Sci.* **55**, 53-67 (1994).
117. Inoue T., Yang D. J., Oriuchi N., Wallace S., Buzdar A., Tansey W., Kim E. E., Cherif A., Kuang L. R., Podoloff D. A. Positron emission tomography with F-18 fluorotamoxifen in patients with breast cancer. *J. Nucl. Med.* **37**(Suppl), 86P (1996).
118. VanBrocklin H. F., Carlson K. E., Katzenellenbogen J. A., Welch M. J. 16 $\beta$ -([<sup>18</sup>F]Fluoro)estrogens: Systematic investigation of a new series of fluorine-18-

- labeled estrogens as potential imaging agents for estrogen-receptor-positive breast tumors. *J. Med. Chem.* **36**, 1619-1629 (1993).
119. VanBrocklin H. F., Rocque P. A., Lee H. V., Carlson K. E., Katzenellenbogen J. A., Welch M. J.  $16\beta$ -[ $^{18}\text{F}$ ]Fluoromoxestrol : a potent, metabolically stable positron emission tomography imaging agent for estrogen receptor positive human breast tumors. *Life Sci.* **53**, 811-819 (1993).
120. Jonson S. D., Bonasera T. A., Dehdashti F., Cristel M. E., Katzenellenbogen J. A., Welch M. J. Comparative breast tumor imaging and comparative in vitro metabolism of  $16\alpha$ -[ $^{18}\text{F}$ ]fluoroestradiol- $17\beta$  and  $16\alpha$ -[ $^{18}\text{F}$ ]fluoromoxestrol in isolated hepatocytes. *Nucl. Med. Biol.* **26**, 123-130 (1999).
121. Kiesewetter D. O., Katzenellenbogen J. A., Kilbourn M. R., Welch M. J. Synthesis of 16-fluoroestrogens by unusually facile fluoride ion displacement reactions: Prospects for the preparation of fluorine-18 labeled estrogens. *J. Org. Chem.* **49**, 4900-4905 (1984).
122. Berridge M. S., Franceschini M. P., Rosenfeld E., Tewson T. J. Cyclic sulfates: Useful substrates for selective nucleophilic substitution. *J. Org. Chem.* **55**, 1211-1217 (1990).
123. Lim J. L., Berridge M. S., Tewson T. J. Preparation of [ $^{18}\text{F}$ ]16 $\alpha$ -fluoro-17 $\beta$ -estradiol by selective nucleophilic substitution. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **35**, 176-177 (1994).
124. Lim J. L., Zheng L., Berridge M. S., Tewson T. J. The use of 3-methoxymethyl-16 $\beta$ ,17 $\beta$ -epiestriol-O-cyclic sulfone as the precursor in the synthesis of F-18 16 $\alpha$ -fluoroestradiol. *Nucl. Med. Biol.* **23**, 911-915 (1996).
125. Römer J., Steinbach J., Kasch H. Studies on the synthesis of 16 $\alpha$ -[ $^{18}\text{F}$ ]fluoroestradiol. *Appl. Radiat. Isot.* **47**, 395-399 (1996).
126. Flanagan F. L., Dehdashti F., Siegel B. A. PET in breast cancer. *Sem. Nucl. Med.* **28**, 290-302 (1998).
127. Mintun M. A., Welch M. J., Siegel B. A., Mathias C. J., Brodack J. W., McGuire A. H., Katzenellenbogen J. A. Breast Cancer: PET imaging of estrogens receptors. *Radiology* **169**, 45-48 (1988).

128. McGuire A. H., Dehdashti F., Siegel B. A., Lyss A. P., Brodack J. W., Mathias C. J., Mintun M. A., Katzenellenbogen J. A., Welch M. J. Positron tomographic assessment of  $16\alpha$ - $^{18}\text{F}$ fluoro- $17\beta$ -estradiol uptake in metastatic breast carcinoma. *J. Nucl. Med.* **32**, 1526-1531 (1991).
129. Dehdashti F., Mortimer J. E., Siegel B. A., Griffeth L. K., Bonasera T. J., Fusselman M. J., Detert D. D., Cutler P. D., Katzenellenbogen J. A., Welch M. J. Positron tomographic assessment of estrogen receptor in breast cancer: Comparison with FDG-PET and in vitro receptor assays. *J. Nucl. Med.* **36**, 1766-1774 (1995).
130. Dehdashti F., Flanagan F. L., Mortimer J. E., Katzenellenbogen J. A., Welch M. J. Positron emission tomographic assessment of « metabolic flare » to predict response of metastatic breast cancer to antiestrogen therapy. *Eur. J. Nucl. Med.* **26**, 51-56 (1999).
131. Stalford A. C., Maggs J. L., Gilchrist T. L., Park B. K. The metabolism of  $16\alpha$ -fluoroestradiols in vivo: chemical strategies for restricting the oxidative biotransformations of an estrogen-receptor imaging agent. *Steroids.* **62**, 750-761 (1997).
132. Mankoff D. A., Tewson T. J., Eary J. F. Analysis of blood clearance and labeled metabolites for the estrogen receptor tracer  $^{18}\text{F}$ - $16\alpha$ -fluoroestradiol (FES). *Nucl. Med. Biol.* **24**, 341-348 (1997).
133. Tewson T. J., Mankoff D. A., Peterson L. M., Woo I., Petra P. Interactions of  $16\alpha$ - $^{18}\text{F}$ -fluoroestradiol (FES) with sex steroid binding protein (SBP). *Nucl. Med. Biol.* **26**, 905-913 (1999).
134. Pan C. C., Woolever C. A., Bhavnani B. R. Transport of equine estrogens: binding of conjugated and unconjugated equine estrogens with human serum proteins. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **61**, 499-507 (1985).
135. Wolf W., Presant C. A., Waluch V.  $^{19}\text{F}$ -MRS studies of fluorinated drugs in humans. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **41**, 55-74 (2000).
136. Phelps M. E. PET: The merging of biology and imaging into molecular imaging. *J. Nucl. Med.* **41**, 661-681 (2000).



137. Umemoto T., Fukami S., Tomizawa G., Harasawa K., Kawada K., Tomita K. Power and structure-variable fluorinating agents. The *N*-fluoropyridinium salt system. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 8563-8575 (1990).
138. Poss A. J., Van der Puy M., Nalewajek D., Shia G. A., Wagner W. J., Frenette R. L. *N*-Fluoropyridinium pyridine heptafluorodiborate: A useful fluorinating agent. *J. Org. Chem.* **56**, 5962-5964 (1991).
139. Mathias C. J., Welch M. J., Katzenellenbogen J. A., Brodack J. W., Kilbourn M. R., Carlson K. E., Kiesewetter D. O. Characterization of the uptake of 16 $\alpha$ -([<sup>18</sup>F]fluoro)-17 $\beta$ -estradiol in DMBA-induced mammary tumors. *Nucl. Med. Biol.* **14**, 15-25 (1987).
140. Ali H., Rousseau J., Gantchev T. G., van Lier J. E. 2- and 4-fluorinated 16 $\alpha$ -[<sup>125</sup>I]iodoestradiol derivatives: Synthesis and effect on estrogen receptor binding and receptor-mediated target tissue uptake. *J. Med. Chem.* **36**, 4255-4263 (1993).
141. Ali H., Rousseau J., van Lier J. E. Synthesis of A-ring fluorinated derivatives of (17 $\alpha$ ,20E/Z)-[<sup>125</sup>I]iodovinylestradiols: effect on receptor binding and receptor-mediated target tissue uptake. *J. Med. Chem.* **36**, 3061-3072 (1993).
142. Kirk K. L., Cantacuzene D., Collins B., Chen G. T., Nimit Y., et al. Synthesis and adrenergic agonist properties of ring-fluorinated isoproterenols. *J. Med. Chem.* **25**, 680-684 (1982).
143. Morgan P., Maggs J. L., Page P. C. B., Park B. K. Oxidative dehalogenation of 2-fluoro-17 $\alpha$ -ethynylestradiol in vivo. A distal structure-metabolism relationship of 17 $\alpha$ -ethynylation. *Biochem. Pharmacol.* **44**, 1717-1724 (1992).
144. Stalford A. C., Maggs J. L., Gilchrist T. L., Park B. K. Catecholestrogens as mediators of carcinogenesis - correlation of aromatic hydroxylation of estradiol and its fluorinated analogs with tumor-induction in syrian-hamsters. *Mol. Pharmacol.* **45**, 1259-1267 (1994).
145. Morgan P., Maggs J. L., Bulman-Page P. C., Hussain F., Park B. K. The metabolism of 2- and 4-fluoro-17 $\beta$ -estradiol in the rat and its implications for estrogen carcinogenesis. *Biochem. Pharmacol.* **43**, 985-994 (1992).

146. Hostetler E. D., Jonson S. D., Welch M. J., Katzenellenbogen J. A. Synthesis of 2- $^{18}\text{F}$ fluoroestradiol, a potential diagnostic imaging agent for breast cancer: Strategies to achieve nucleophilic substitution of an electron-rich aromatic ring with  $^{18}\text{F}^-$ . *J. Org. Chem.* **64**, 178-185 (1999).
147. Helmer F., Kiehs K., Hansch C. The linear free-energy relationship between partition coefficients and the binding and conformational perturbation of macromolecules by small organic compounds. *Biochemistry.* **7**, 2858-2863 (1968).
148. Katzenellenbogen J. A., McElvany K. D., Senderoff S. G., Carlson K. E., Landvatter S. W., Welch M. J.  $16\alpha$ - $^{77}\text{Br}$ Bromo- $11\beta$ -methoxyestradiol- $17\beta$ : A gamma-emitting estrogen imaging agent with high uptake and retention by target organs. *J. Nucl. Med.* **23**, 411-419 (1982).
149. Rijks L. J. M., Boer G. J., Endert E., de Bruin K., van den Bos J. C., van Doremalen P. A. P. M., Schoonen W. G. E. J., Janssen A. G. M., van Royen E. A. The stereoisomers of  $17\alpha$ - $^{123}\text{I}$ iodovinylloestradiol and its  $11\beta$ -methoxy derivative evaluated for their oestrogen receptor binding in human MCF-7 cells and rat uterus, and their distribution in immature rats. *Eur. J. Nucl. Med.* **23**, 295-307 (1996).
150. Pomper M. G., VanBrocklin H., Thieme A. M., Thomas R. D., Kiesewetter D. O., Carlson K. E., Mathias C. J., Welch M. J., Katzenellenbogen J. A.  $11\beta$ -Methoxy-,  $11\beta$ -ethyl- and  $17\alpha$ -ethynyl-substituted  $16\alpha$ -fluoroestradiols: receptor-based imaging agents with enhanced uptake efficiency and selectivity. *J. Med. Chem.* **33**, 3143-3155 (1990).
151. Ali H., Rousseau J., Ghaffari M. A., van Lier J. E. Synthesis, receptor binding, and tissue distribution of  $7\alpha$ - and  $11\beta$ -substituted ( $17\alpha,20\text{E}$ )- and ( $17\alpha,20\text{Z}$ )- $21$ - $^{125}\text{I}$ iodo- $19$ -norpregna- $1,3,5(10),20$ -tetraene- $3,17$ -diols. *J. Med. Chem.* **34**, 854-860 (1991).
152. Seimbille Y., Ali H., van Lier J. E. Synthesis of  $2,16\alpha$ - and  $4,16\alpha$ -difluoroestradiols and their  $11\beta$ -methoxy derivatives as potential estrogen receptor-binding radiopharmaceuticals. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* **5**, 657-663 (2002).
153. Patrick T. B., Mortezaia R. Synthesis of  $16\alpha$ - and  $16\beta$ -fluoro- $17\beta$ -estradiol by fluorination of estrone enols. *J. Org. Chem.* **53**, 5153-5155 (1988).

154. Umemoto T., Kawada K., Tomita K. *N*-Fluoropyridinium triflate and its derivatives: Useful fluorinating agent. *Tetrahedron Lett.* **27**, 4465-4468 (1986).
155. Umemoto T., Tomita K., Kawada K. *N*-Fluoropyridinium triflate: An electrophilic fluorinating agent. *Org. Synth.* **69**, 129-143 (1990).
156. Bulman Page P. C., Hussain F., Maggs J. L., Morgan P., Park B. K. Efficient regioselective A-ring functionalization of oestrogens. *Tetrahedron.* **46**, 2059-2068 (1990).
157. Senderoff S. G., McElvany K. D., Carlson K. E., Heiman D. F., Katzenellenbogen J. A., Welch M. J. Methodology for the synthesis and specific activity determination of  $16\alpha$ -[ $^{77}\text{Br}$ ]-bromoestradiol- $17\beta$  and  $16\alpha$ -[ $^{77}\text{Br}$ ]- $11\beta$ -methoxyestradiol- $17\beta$ , two estrogen receptor-binding radiopharmaceuticals. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **33**, 545-551 (1982).
158. Oberdorfer F., Hofmann E., Maier-Borst W. Preparation of  $^{18}\text{F}$ -labelled *N*-fluoropyridinium triflate. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **25**, 999-1005 (1988).
159. Ko S. Y. Vicinal diol cyclic thionocarbonates: Like cyclic sulfates, and more. *J. Org. Chem.* **60**, 6250-6251 (1995).
160. VanBrocklin H. F., Liu A., Welch M. J., O'Neil J. P., Katzenellenbogen J. A. The synthesis of  $7\alpha$ -methyl-substituted estrogens labeled with fluorine-18: Potential breast tumor agents. *Steroids.* **59**, 34-45 (1994).
161. Baran J. S. A synthesis of  $11\beta$ -hydroxyestrone and related 16- and 17-hydroxyestratrienes. *J. Med. Chem.* **10**, 1188-1190 (1967).
162. Beierbeck H., Saunders J. K. A new interpretation of the  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -substituent effects on the  $^{13}\text{C}$  chemical shift. *Can. J. Chem.* **54**, 2985 (1976).
163. Goren M. B., Kochansky M. E. The stringent requirement for electrophiles in the facile solvolytic hydrolysis of neutral sulfate ester salts. *J. Org. Chem.* **38**, 3510-3513 (1973).
164. Liav A., Goren M. B. Sulfatides of mycobacterium tuberculosis. Synthesis of the core  $\alpha,\alpha$ -tetrahalose 2-sulfate. *Carbohyd. Res.* **127**, 211-216 (1984).
165. Seimbille Y., Rousseau J., Bénard F., Ali H., van Lier J.E. Synthesis of  $2,16\alpha$ - and  $4,16\alpha$ -[ $16\alpha$ - $^{18}\text{F}$ ]difluoroestradiols and their  $11\beta$ -methoxy derivatives for estrogen receptor imaging. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **44**, S348-S350 (2001).

166. Brodack J. W., Kilbourn M. R., Welch M. J. Automated production of several positron-emitting radiopharmaceuticals using a single laboratory robot. *Appl. Radiat. Isot.* **39**, 689-698 (1988).
167. Römer J., Fuchtner F., Steinbach J., Johannsen B. Automated production of  $16\alpha$ - $[^{18}\text{F}]$ fluoroestradiol for breast cancer imaging. *Nucl. Med. Biol.* **26**, 473-479 (1999).
168. Seimbille Y., Rousseau J., Bénard F., Morin C., Ali H., Avvakumov G., Hammond G. L., van Lier J. E.  $^{18}\text{F}$  labeled difluoroestradiols: Preparation and preclinical evaluation as estrogen receptor-binding radiopharmaceuticals. *Steroids*. 2002, in press.
169. Zielinski J. E., Yabuki H., Pahuja S. L., Larner J. M., Hochberg R.B.  $16\alpha$ - $[^{125}\text{I}]$ Iodo- $11\beta$ -methoxy- $17\beta$ -estradiol: a radiochemical probe for estrogen-sensitive tissues. *Endocrinology*. **119**, 130-139 (1986).
170. Zielinski J. E., Larner J. M., Hoffer P. B., Hochberg R. B. The synthesis of  $11\beta$ -methoxy- $16\alpha$ - $[^{123}\text{I}]$ iodoestradiol and its interaction with the estrogen receptor in vivo and in vitro. *J. Nucl. Med.* **30**, 209-215 (1989).
171. Lee S. J., McEwen B. S. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogens and their therapeutic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**, 569-591 (2001).
172. Pfaff D. W., Keiner M. Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat. *J. Comp. Neurol.* **151**, 121-158 (1973).
173. Shughrue P. J., Merchenthaler I. Evidence for novel estrogen binding sites in the hippocampus. *Neuroscience*. **99**, 605-612 (2000).
174. Moresco R. M., Scheithauer B. W., Lucignani G., Lombardi D., Rocca A., Losa M., Casati R., Giovanelli M., Fazio F. Oestrogen receptors in meningiomas: A correlative PET and immunohistochemical study. *Nucl. Med. Comm.* **18**, 606-615 (1997).
175. DaSilva J. N., Crouzel C., van Lier J. E. Synthesis of nca  $7\alpha$ -( $11$ - $[^{18}\text{F}]$ fluoroundecyl)-estradiol: Evaluation of a vector for estrogen receptor based agents. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **26**, 342s-343s (1989).

176. DaSilva J. N., van Lier J. E. Synthesis and structure-affinity of a series of  $7\alpha$ -undecylestradiol derivatives: A potential Vector for therapy and imaging of estrogen receptor-positive cancers. *J. Med. Chem.* **33**, 430-434 (1990).
177. Dasilva J. N., van Lier J. E. In vivo evaluation of  $7\alpha$ -[11-(4-[ $^{125}$ I]iodophenoxy)undecyl]- $17\beta$ -estradiol: A potential vector for therapy of adrenal and estrogen receptor-positive cancers. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* **37**, 77-83 (1990).
178. Fink B. E., Mortensen D. S., Stauffer S. R., Aron Z. D., Katzenellenbogen J. A. Novel structural templates for estrogen-receptor ligands and prospects for combinatorial synthesis of estrogens. *Chem. Biol.* **6**, 205-219 (1999).
179. Wakeling A. E. Therapeutic potential of pure antiestrogens in the treatment of breast cancer. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **37**, 771-775 (1990).
180. Tedesco R., Fiaschi R., Napolitano E. 6-Oxoestradiols from estradiols: Exploiting site selective metalation of aralkyl systems with superbases. *Synthesis*. 1493-1495 (1995).
181. Tedesco R., Katzenellenbogen J. A., Napolitano E. An expeditious route to  $7\alpha$ -substituted estradiol derivatives. *Tetrahedron Lett.* **38**, 7997-8000 (1997).
182. Negishi E., Chatterjee S. Highly regioselective generation of « thermodynamic » enolates and their direct characterisation by NMR<sup>1</sup>. *Tetrahedron Lett.* **24**, 1341-1344 (1983).
183. Skaddan M. B., Wüst F. R., Katzenellenbogen J. A. Synthesis and binding affinities of novel Re-containing  $7\alpha$ -substituted estradiol complexes: Models for breast cancer imaging agents. *J. Org. Chem.* **64**, 8108-8121 (1999).
184. Bucourt R., Vignau M., Torelli V., Richart-Foy H., Geynet C., Secco-Millet C., Redeuilh G., Baulieu E. E. New biospecific adsorbents for the purification of estradiol receptor. *J. Biol. Chem.* **253**, 8221-8228 (1978).
185. Rao, P. N.; Cessac, J. W.; Kim, H. K. Preparative chemical methods for aromatization of 19-nor- $\Delta^4$ -3-oxosteroids. *Steroids*. **1994**, *59*, 621-627.
186. Seimbille Y., Bénard F., van Lier J. E. Synthesis of ICI 182,780 derivatives: Powerful antiestrogens to image estrogen receptor densities in breast cancer by positron emission tomography. 2002 (submitted).

187. Madesclaire M. Synthesis of sulfoxides by oxydation of thioethers. *Tetrahedron*. **42**, 5459-5495 (1986).
188. Russel G. A., Ochrymowycz L. A.  $\beta$ -Keto sulfoxides. IX. Conversion into acetylenic sulfoxides and sulfones. *J. Org Chem.* **35**, 2106-2108 (1970).
189. Mikolajczyk M., Grzejszczak S., Zatorski A.  $\alpha$ -Phosphoryl sulfoxides. II. Synthesis of  $\alpha,\beta$ -unsaturated sulfoxides and configurational assignments to geometrical isomers. *J. Org. Chem.* **40**, 1979-1984 (1975).
190. Kaya R., Beller N. R. An improved synthesis of keten dimethyl thioacetal monoxide. *J. Org. Chem.* **46**, 196-197 (1981).
191. Katzenellenbogen B. S. Antiestrogens: Mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **44**, 23-38 (1997).
192. Osborne C. K., Schiff R., Fuqua S. A. W., Shou J. Estrogen receptor: Current understanding of its activation and modulation. *Clin. Cancer Res.* **7**, 4338s-4342s (2001).
193. Wakeling A. E., Nicholson R. I., Gee J. M. W. Prospects for combining hormonal and nonhormonal growth factor inhibition. *Clin. Cancer Res.* **7**, 4350s-4355s (2001).
194. Cobleigh M. A., Vogel C. L., Tripathy D., et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J. Clin. Oncol.* **17**, 2639-2648 (1999).
195. Vogel C. L., Cobleigh M. A., Tripathy D., et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **20**, 719-726 (2002).
196. Levitzki A., Gazit A. Tyrosine kinase inhibitors: An approach to drug development. *Science*. **267**, 1782-1788 (1995).
197. Levitzki A. Targeting signal transduction for disease therapy. *Med. Oncol.* **14**, 83-89 (1997).
198. Lawrence D. S., Niu J. Protein kinase inhibitors. *Pharmacol. Ther.* **77**, 81-114 (1998).
199. Boschelli D. H. Small molecule inhibitors of receptor tyrosine kinases. *Drugs Future.* **24**, 515-537 (1999).

200. Barker A. J., Gibson K. H., Grundy W., et al. Studies leading to the identification of ZD1839 (Iressa<sup>TM</sup>): An orally active, selective epidermal growthfactor receptor tyrosine kinase inhibitor targeted to the treatment of cancer. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**, 1911-1914 (2001).
201. Van de Wiele C., Van Belle S., Slegheers G., Dierckx R. A. Receptor imaging in breast carcinoma: future prospects. *Eur. J. Nucl. Med.* **28**, 675-679 (2001).
202. Hähnel E., Harvey J. M., Joyce R., Robbins P. D., Sterrett G. F., Hähnel R. Stromelysin-3 expression in breast cancer biopsies: Clinico-pathological correlations. *Int. J. Cancer.* **55**, 771-774 (1993).
203. Brown P. D. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Breast Cancer Res. Treat.* **52**, 125-136 (1998).
204. Whittaker M., Floyd C. D., Brown P., Gearing A. J. H. Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. *Chem. Rev.* **99**, 2735-2776 (1999).
205. Zheng Q. H., Hutchins G. D., Mock B. H., Winkle W. L. MMP inhibitor radiotracer [<sup>11</sup>C]methyl-CGS 27023A: A new PET breast cancer imaging agent. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **44**, S104-S106 (2001).
206. Berger F., Gambhir S. S. Recent advances in imaging endogenous or transferred gene expression utilizing radionuclide technologies in living subjects: Applications to breast cancer. *Breast Cancer Res.* **3**, 28-35 (2001).