

ÉCOLE DOCTORALE SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

Centre de Biophysique Moléculaire- CNRS UPR4301

THÈSE présentée par :

Sophie LAINE

soutenue le : **22 Novembre 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Chimie

**Complexes de lanthanide pour la détection
d'activité enzymatique par IRM**

THÈSE dirigée par :

Dr. Eva JAKAB-TOTH

Directrice de Recherche, CNRS, Orléans

Co-encadrants :

Dr. Célia BONNET

Chargée de Recherche, CNRS, Orléans

Dr. Jean-François MORFIN

Ingénieur de Recherche, CNRS, Orléans

RAPPORTEURS :

Prof. Franck DENAT

Professeur, Université de Bourgogne, Dijon

Prof. Lothar HELM

Professeur, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne,
Suisse

JURY :

Prof. Franck DENAT

Professeur, Université de Bourgogne, Dijon

Prof. Lothar HELM

Professeur, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne,
Suisse

Prof. Franck SUZENET

Professeur, Université d'Orléans, Orléans

Prof. Eric BENOIST

Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse

Dr. Philippe DURAND

Chargé de Recherche, CNRS, Gif-sur-Yvette

Dr. Eva JAKAB-TOTH

Directrice de Recherche, CNRS, Orléans

A mes grands-parents, Marcel, Emile, Marie-Louise et Rosa,

A mes parents,

Remerciements

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au Centre de Biophysique moléculaire (CBM) à Orléans, et a été financée par une bourse de la Région Centre Val de Loire. Une partie des travaux présentés a été réalisée au Département de Chimie Inorganique et Analytique de l'Université de Debrecen (Hongrie) avec la participation d'un financement COST TD1004 STSM et du programme Balaton.

Je souhaite dans premier temps remercier les rapporteurs et les membres du jury d'avoir accepté l'examen de ces travaux de thèse.

Mes plus sincères remerciements sont adressés à ma directrice de Thèse, Eva Jakab Toth pour m'avoir accueillie dans son équipe. Merci de m'avoir initiée à la chimie /physico-chimie des agents de contraste et de m'avoir fait partager ton savoir. Merci Eva pour tous les moments que nous avons partagés ces trois dernières années, merci pour la confiance et la bienveillance que tu m'as accordées.

Je souhaite également remercier mes co-encadrants, Célia Bonnet et Jean-François Morfin. Tout d'abord, merci pour votre patience, votre présence et votre soutien qui sont une réelle chance pour moi et pour tous les étudiants de passage. Merci Célia de m'avoir fait partager tes connaissances, merci de m'avoir guidé ces trois années durant, merci d'avoir été présente même quand tu n'aurais pas dû l'être. Merci Chef J-F pour nos discussions dans le labo d'orga et pour nos désaccords qui m'ont finalement mise d'accord !

Je souhaite également remercier chaleureusement Philippe Durand pour son implication active dans mon projet de recherche, pour sa grande disponibilité. Je remercie vivement son doctorant Rémi pour la synthèse « sous pression » de certains complexes. Merci Rémi pour ta grande gentillesse et pour ces discussions très enrichissantes que nous avons eues.

Je souhaite adresser mes plus sincères remerciements à Imre Toth et Gyula Tircso pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire à Debrecen. A special thanks to Gyula for sharing your high knowledge and your precious time with me. I would like to thank Ferenc Kalman for his help and his generosity. I also would like to address very special thanks to Katalin Takács to have been a real second mum for me in Debrecen and thank to your nice and lovely family too. I would also thank everybody in the lab in Debrecen for welcoming me so nicely.

Nagyon szépen köszönöm mindnekinek. Soha nem fogom elfelejteni a veletek töltött időt.

Un grand merci à Agnès, merci pour ta gentillesse, merci pour ton soutien et pour tout ce que j'ai appris à tes côtés et en te regardant travailler. Je remercie également Sara et Fatima pour les discussions scientifiques que nous avons eues, pour les conseils avisés que vous m'avez donnés et pour le soutien et les encouragements que vous m'avez apportés.

Merci à toutes les personnes qui ont travaillé à mes côtés. Je remercie Vincent Aucagne, Mathieu Galibert, Victor Terrier et Mehdi Amoura pour avoir partagé un peu de leur connaissance et de leur expérience de la synthèse peptidique avec moi. Je remercie également Hervé Meudal pour son aide en RMN. Merci à Guillaume Gabant et Cyril Colas pour les analyses de spectrométrie de masse. Je remercie aussi Stéphane Charpentier et Amandine Serrano pour leurs conseils et leur aide concernant les réactions enzymatiques.

Remerciements

Merci à mes amis et partenaires de « galère » et de bureau, Patrick alias « Pascal ou Président », tu auras presque réussi à me rendre folle ! Maamar alias « Zing Lee », désolée j'ai mangé tout le chocolat qui restait... Dounia et Alba, vos câlins-réconfort vont me manquer... Merci à vous quatre pour votre présence, votre bonne humeur, merci pour tous les moments que nous avons partagés ensemble. Vous avez été un véritable soutien à chaque étape de ma thèse. Bon courage pour la suite.

J'ai également une pensée pour tous les stagiaires qui sont passés dans notre bureau notamment Dorina qui a participé activement à certaines mesures et Enzo, stagiaire et accessoirement neveu idéal.

Je souhaite remercier vivement toutes les nombreuses personnes qui ont effectué la relecture de ce manuscrit, notamment Ali, ma maman Rosine et sa cousine Angeline pour leurs corrections pleines d'humour, merci de m'avoir sauvé de « l'attaque du Lion » !

Je remercie tous les membres de l'équipe, Eva, Jean-François, Célia, Agnès, Fatima, Sara, Sandra, William, Fréd, Patrick, Dounia, Maamar, pour tous les bons moments que j'ai passés parmi vous, pour tous « les goûters » que nous avons partagés ensemble. Est-ce que « finir sa thèse » est sur la liste des nombreuses occasions pour lesquelles on doit ramener un gâteau ??

Pour finir, je souhaite remercier ma famille, en particulier mes parents, mon frère et mes sœurs, pour m'avoir soutenue, encouragée et réconfortée, merci de m'avoir mise en confiance pendant les moments difficiles ces trois années durant, merci d'être là pour moi. Un merci tout aussi spécial à Thomas, pour tous les « allers-retours » que tu fais pour moi, merci d'être l'épaule sur laquelle je peux m'appuyer. Merci à tous pour votre présence (même ceux qui sont loin), merci de me supporter (mention spéciale pour Thomas), vous êtes mes modèles, mes rayons de soleil.

Abréviations

Abréviations

AA	Acide aminé
AC	Agent de contraste
AFC	7-amido-4-trifluorométhylcoumarine
AMC	7-amido-4-méthylcoumarine
BAL	Acide 5-(4-Formyl-3,5-dimethoxyphenoxy)valerique
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyle
BSA	Albumine de Sérum Bovin
Cbz	Carboxybenzyle
CEST	Transfert de Saturation par Echange Chimique
COSY	Spectroscopie de corrélation homonucléaire (COrrélation SpectroscopY)
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimide
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamine
DMF	Diméthylformamide
DNPH	2,4-dinitrophénylhydrazine
DOTA	Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique
DO3A	Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7-triacétique
DOTAM	1,4,7,10-tetraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétamide
DTPA	Acide diéthylènetriamine-pentaacétique
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
Fmoc	Fluorénylmétoxycarbonyle
FSN	Fibrose Systémique Néphrogénique
HATU	1-[Bis(diméthylamino)méthylène]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate
HCTU	2-(6-Chloro-1-H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthylaminium hexafluorophosphate
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
HRMS	Spectroscopie de masse haute résolution
HSA	Albumine de Sérum Humain
IRM	Imagerie par résonance magnétique
LIS	Déplacement chimique induit par un lanthanide (Lanthanide Induced Shift)
NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimide
NMRD	Dispersion de la Relaxation Magnétique Nucléaire
NOTA	1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacétate
Oxima Pure	Ethyl cyano(hydroxymino)acetate
Pbf	2,2,4,6,7-pentaméthyl-dihydrobenzofurane-5-sulfonyle
Py	Pyridine
PyBOP	Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate
QUESP	Quantification de la vitesse d'échange par modulation de la puissance de saturation
QUEST	Quantification de la vitesse d'échange par modulation du temps de saturation
RF	Radio fréquence
RM	Résonance magnétique

Abréviations

RMN	Résonance magnétique nucléaire
SAP	Conformation carré anti prismatique
SBM	Solomon-Bloembergen-Morgan
TAEA	Tris(2-aminoéthyl)amine
TBAF	Fluorure de tétra-n-butylammonium
TEMP	Tomographie par émission monophotonique
TEP	Tomographie par émission de positron
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TIPS	Triisopropylsilane
TSAP	Conformation carré anti prismatique distordu
ZFS	Zero Field Splitting

Sommaire

Chapitre 1 : Introduction18

1.1	Imagerie par Résonance Magnétique (IRM).....	24
1.1.1	Historique.....	24
1.1.2	Principe de base de l'IRM.....	25
1.1.3	Obtention du contraste en IRM.....	28
1.2	Les lanthanides.....	30
1.2.1	Introduction.....	30
1.2.2	Propriétés magnétiques et optiques des lanthanides.....	32
1.2.3	Toxicité des lanthanides.....	36
1.3	Les agents de contraste pour l'IRM.....	37
1.3.1	Les agents de contraste T ₁	37
1.3.2	Les agents de contraste ParaCEST.....	44
1.4	Imagerie moléculaire et agents de contraste responsifs	50
1.4.1	Agents responsifs pour la détection de l'activité enzymatique.....	50
1.5	Objectifs de la Thèse	58
1.6	Références.....	59

Chapitre 2 : Complexes de Ln³⁺ comportant un espaceur auto-immolable : étude de l'influence de la position de l'espaceur sur les propriétés de relaxivité et de paraCEST, application à la détection de la β -galactosidase..... 65

2.1.	Introduction.....	67
2.2.	Influence de la substitution de la pyridine sur les propriétés de relaxation des complexes.....	69
2.3.	Influence de la substitution de la pyridine sur les propriétés de paraCEST des complexes.....	73
2.4.	Caractérisation des effets CEST des complexes Yb(DO3A-Py-Cbz(5)) et Yb(DO3A-Py-NH₂(5)).....	76
2.4.1.	Mise en évidence de la présence d'isomères en solution.....	76
2.4.2.	Influence du pH.....	80
2.4.3.	Détermination des constantes de vitesse d'échange, k_{ex}	83
2.5.	Coupure enzymatique.....	93
2.5.1.	Suivi de la réaction enzymatique par paraCEST.....	94
2.5.2.	Suivi de la réaction enzymatique par relaxivité.....	97

2.6. Conclusion.....	99
2.7. Références.....	100

Chapitre 3 : Etudes de la stabilité thermodynamique et de l'inertie cinétique de complexes de Ln³⁺ formés à partir des ligands DO3A-Py-Cbz(6) et DO3A-Py-NH₂(6)103

3.1. Introduction.....	105
3.2. Propriétés thermodynamiques.....	107
3.2.1. Constantes de protonation.....	107
3.2.2. Constantes de stabilité.....	108
3.3. Propriétés cinétiques.....	113
3.3.1. Cinétique de dissociation en milieu acide.....	115
3.3.2. Cinétique de dissociation assistée par les ions Cu ²⁺ des complexes [Ce(DO3A-Py-NH ₂ (6))] et [Gd(DO3A-Py-NH ₂ (6))].	119
3.4. Conclusion.....	121
3.5. Références.....	122

Chapitre 4 : Etude de l'influence du lanthanide et de la nature du proton échangeable sur l'effet CEST.....125

4.1. Introduction.....	127
4.2. Détermination du nombre d'hydratation du complexe.....	128
4.3. Influence du lanthanide et de la nature du proton échangeable sur l'effet CEST	130
4.3.1. Influence du lanthanide sur l'effet CEST.....	131
4.3.2. Influence de la nature du proton échangeable sur l'effet CEST : comparaison entre un proton amide et carbamate.....	137
4.4. Influence du pH et constantes de vitesse d'échange.....	139
4.4.1. Détermination de la présence d'isomères en solution.....	140
4.4.2. Influence du pH sur l'effet CEST.....	142
4.4.3. Détermination des constantes de vitesse d'échange k_{ex}	146
4.5. Conclusion.....	152
4.6. Référence.....	153

Chapitre 5 : Complexes de lanthanide pour la détection de l'urokinase et de la caspase-3 : synthèse et caractérisation.....155

5.1. Introduction.....	157
5.2. Synthèse des ligands.....	160
5.2.1. Synthèse des ligands L ₁ et L ₂	160
5.2.2. Synthèse des ligands L ₃ et L ₄	163
5.2.2.1. Synthèse des ligands L ₃ et L ₄ sur support solide.....	163
5.2.2.2. Synthèse du ligand L ₃ en solution.....	167
5.3. Détermination du nombre d'hydratation q et comparaison entre les complexes LnL₂, LnL₃, LnL₄ et LnL₁	172
5.4. Caractérisation des effets paraCEST.....	176
5.4.1. Propriétés paraCEST.....	176
5.5. Etudes enzymatiques.....	182
5.5.1. Suivi de la coupure enzymatique de GdL ₃ par l'urokinase.....	182
5.5.2. Suivi de la coupure enzymatique de GdL ₄ par la caspase-3.....	185
5.5.3. Bilan des coupures enzymatique.....	188
5.6. Conclusion.....	189
5.7. Références.....	190

Chapitre 6 : Etudes de stabilité thermodynamique et inertie cinétique : Etude de complexes de manganèse(II) à base de pyridine.....193

6.1. Introduction.....	195
6.2. Propriétés Thermodynamiques.....	197
6.2.1. Constantes de protonation.....	197
6.2.2. Constantes de stabilité.....	198
6.3. Propriétés cinétiques.....	203
6.4. Propriétés de relaxation.....	207
6.4.1. Mesures de relaxivité des complexes [MnL ₆] ²⁻ et [MnL ₇] ⁻	207
6.4.2. Mesures de RMN de l' ¹⁷ O et de NMRD ¹ H sur le complexe [MnL ₇] ⁻	208
6.5. Conclusion.....	214
6.6. Références.....	215

Conclusion et perspectives217

Partie expérimentale222

7.1.	Experimental procedures to Chapter 2.....	226
7.2.	Experimental procedures to Chapter 3.....	228
7.3.	Experimental procedures to Chapter 4.....	231
7.4.	Experimental procedures to Chapter 5.....	233
7.5.	Experimental procedures to Chapter 6.....	251
7.6.	References.....	254

Annexes253

8.1.	Equations used for treatment of the relaxometric data.....	257
8.2.	LC/MS spectra of complexes from Chapter 2	260
8.3.	LC/MS spectra of complexes from Chapter 4	283

Chapitre 1

Introduction

Table des matières

1.1	Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)	24
1.1.1	Historique	24
1.1.2	Principe de base de l'IRM	25
1.1.3	Obtention du contraste en IRM	28
1.2	Les lanthanides	30
1.2.1	Introduction	30
1.2.2	Propriétés magnétiques et optiques des lanthanides	32
1.2.3	Toxicité des lanthanides	36
1.3	Les agents de contraste pour l'IRM	37
1.3.1	Les agents de contraste T ₁	37
1.3.2	Les agents de contraste ParaCEST	44
1.4	Imagerie moléculaire et agents de contraste responsifs	50
1.4.1	Agents responsifs pour la détection de l'activité enzymatique	50
1.5	Objectifs de la Thèse	58
1.6	Références	59

Depuis des milliers d'années l'Homme porte un intérêt certain à la connaissance de son corps. La recherche incessante de la compréhension du corps humain pousse celui-ci à se poser ces questions: de quoi notre corps est-il constitué, comment fonctionne-t-il ?

La découverte des Rayons X par Wilhelm Röntgen en 1895 marque le début d'une nouvelle ère offrant la possibilité d'observer l'intérieur du corps humain d'une personne vivante, sans nécessiter d'ouverture chirurgicale. Près de 120 ans après cette découverte majeure, l'imagerie médicale a fait des progrès remarquables et offre une grande diversité de techniques. Aujourd'hui, l'imagerie médicale fait partie de la vie courante et facilite le diagnostic et le suivi d'une maladie. Les médecins peuvent observer les détails du corps humain à l'aide de nombreuses techniques comme la radiographie, la tomographie par émission de positron, la tomographie par émission mono-photonique, l'imagerie par résonance magnétique, les ultrasons, et encore bien d'autres.

Parmi ces différentes modalités, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) offre l'avantage d'être inoffensive et de posséder une excellente résolution. En dépit de ces nombreux avantages, l'inconvénient principal de l'IRM reste sa faible sensibilité. Améliorer la sensibilité de cette technique d'imagerie constitue l'un des enjeux majeurs du domaine. Une des stratégies clés de l'amélioration de la sensibilité de l'IRM est l'utilisation d'agents de contraste. C'est sur le développement d'agents de contraste dédiés à cette technique que se porte l'intérêt des travaux présentés ici.

1.1 Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)

1.1.1 Historique

Si les premières images de l'intérieur du corps humain ont été possibles dès 1895 grâce aux rayons X, il faudra attendre 1970 pour obtenir la première image du corps humain par résonance magnétique.

Bien que dans l'histoire de l'imagerie médicale l'Imagerie par Résonance Magnétique est plutôt récente, son développement est rythmé par l'obtention de plusieurs prix Nobel.

L'IRM puise son origine dans la RMN (résonance magnétique nucléaire) dont les débuts remontent à plus d'un siècle. De nombreux scientifiques provenant de domaines différents ont apporté leur contribution, depuis les débuts de la RMN jusqu'à la première image obtenue par résonance magnétique (RM), amenant la discipline où elle en est aujourd'hui [1].

Entre 1940 et 1970, la recherche en RMN se développe aussi bien dans le domaine de la physique que celui de la biologie. L'américain Raymond DAMADIAN a été le premier à étudier les cellules en utilisant la résonance magnétique. En 1972, il démontre que les tissus cancéreux possèdent des temps de relaxation plus longs que les tissus sains [2]. Convaincu du potentiel de la RM pour la détection du cancer, il consacra le restant de sa carrière à l'élaboration d'un scanner IRM [3]. Il publia en 1973 dans un brevet le croquis d'un système de diagnostic basé sur le principe de résonance magnétique (**figure 1.1**) [4]. Ce système était à une dimension et n'a jamais été conçu comme appareil d'imagerie.

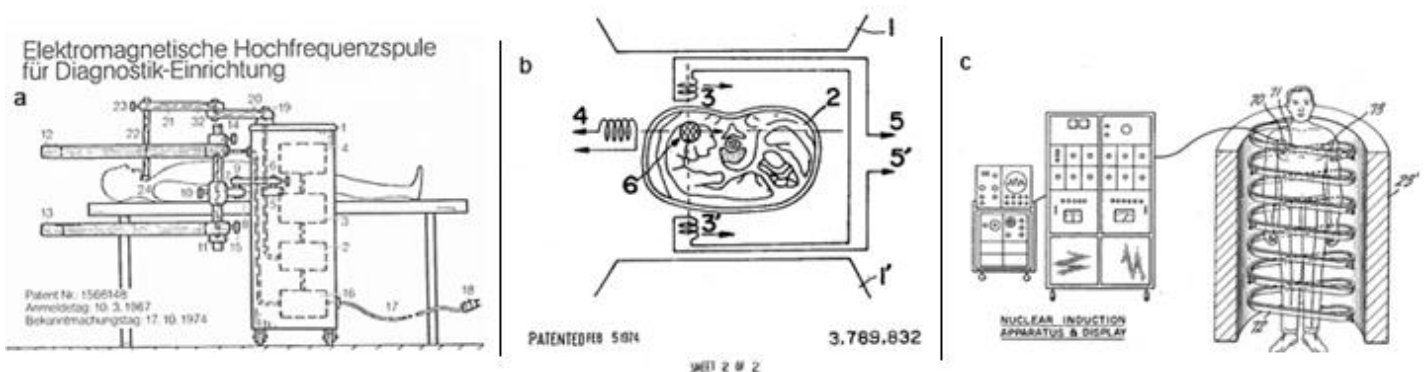


Figure 1.1 : Croquis d'imageurs RM publiés dans différents brevets. GANSSEN 1967/1974 (a), Abe 1973 (b), DAMADIAN 1972/1974 (c) [4]

L'introduction de la notion de gradient de champs par Paul LAUTERBUR et Peter MANSFIELD permet de surpasser le manque d'information spatiale des expériences de RM à une dimension [5,6]. Ils obtinrent conjointement le prix Nobel de Médecine en 2003. Ainsi les premiers prototypes d'imageurs RM ont été proposés dès le début des années 80 (**figure 1.2**).



Figure 1.2 : Prototype d'imageur RM 1980 [7]

En presque 40 ans, l'IRM est devenu un outil d'imagerie incontournable du diagnostic médical avec des applications dans de nombreux domaines tels que la neurologie, la cardiologie ou encore l'orthopédie. De nos jours la recherche tend vers l'amélioration du contraste sur les images de RM pour faciliter le diagnostic médical.

1.1.2 Principe de base de l'IRM

Les expériences d'IRM se concentrent sur l'étude des noyaux des atomes d'hydrogène présents sur les molécules d'eau, étant donné que l'hydrogène possède des propriétés RMN très favorables et que l'eau représente les molécules les plus abondantes du vivant.

La résonance magnétique nucléaire consiste en l'étude d'un noyau atomique présent dans un échantillon donné et soumis à un champ magnétique fixe (\vec{B}_0) (appliqué suivant un axe Oz) et un champ électromagnétique oscillant (onde électromagnétique, radiofréquence) (\vec{B}_1).

Chapitre 1

En l'absence de champ magnétique, les moments magnétiques (μ_{eff}) des atomes d'hydrogène sont orientés de façon aléatoire. Placés dans un champ magnétique \vec{B}_0 , ces moments magnétiques vont s'aligner selon la direction du champ, c'est l'état d'équilibre (**figure 3 (a)**).

Ces moments magnétiques sont en fait en précession autour du champ \vec{B}_0 suivant une fréquence dépendante de la nature du noyau et décrite par l'équation de Larmor (**équation 1.1**).

$$\nu_0 = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \quad (1.1)$$

Avec ν_0 correspondant à la fréquence de précession du noyau, proportionnelle au champ B_0 , et γ le rapport gyromagnétique, spécifique à chaque noyau.

Lorsque l'état d'équilibre ainsi décrit est perturbé par l'application d'une onde radiofréquence (RF) \vec{B}_1 (appliquée dans le plan xOy selon Ox), les moments magnétiques (μ_{eff}) vont entrer en résonance avec ce champ et précesser autour de \vec{B}_1 (**figure 1.3 (b)**).

A la fin de l'application de cette onde RF, les moments magnétiques vont retourner à leur état d'équilibre, c'est le phénomène de relaxation (**figure 1.3 (c)**). Lors de la relaxation, le système émet une onde électromagnétique appelée signal ou FID (Free Induction Decay) dont la transformée de Fourier donnera le spectre (**figure 1.3 (d et e)**) [8].

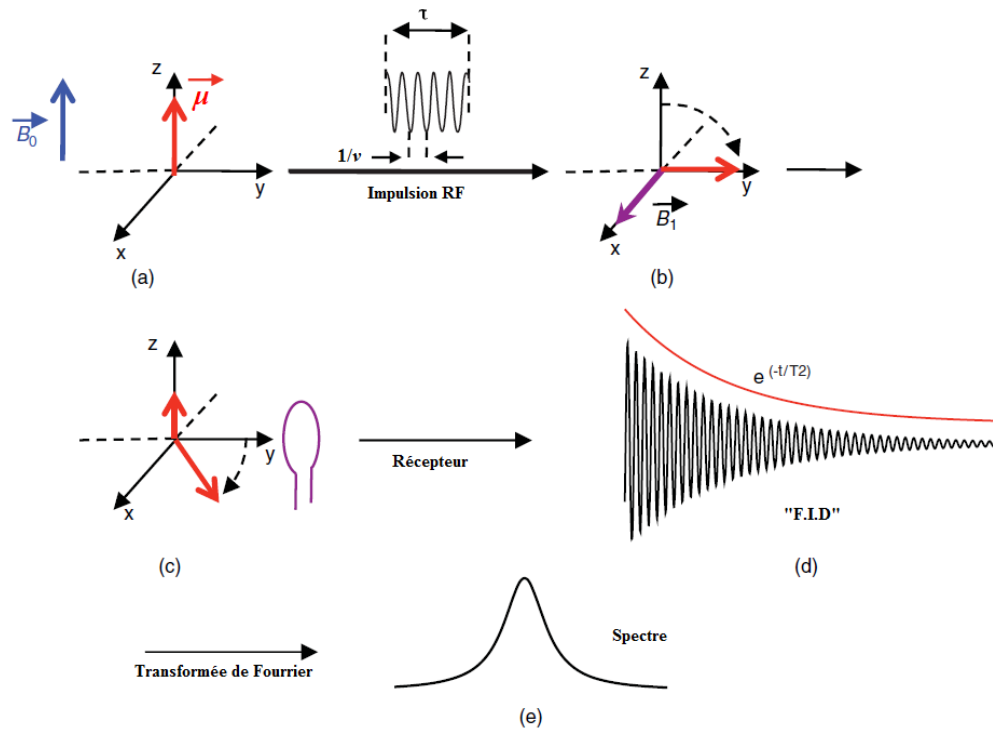


Figure 1.3 : Principe de la RMN [8]

La relaxation des moments magnétiques peut se faire de manière longitudinale (relaxation T_1) ou transversale (relaxation T_2) :

Le temps relaxation longitudinale T_1 est caractéristique du temps de retour à l'équilibre de la magnétisation (ou moments magnétiques) le long de l'axe z (M_z) (**équation 1.2**). Elle est également appelée relaxation spin-réseau car lors du retour des protons du haut niveau d'énergie vers un niveau d'énergie plus bas, il y a émission de l'énergie qui a été absorbée lors de l'excitation, par interaction avec le milieu environnant (réseau).

$$M_z = M_0(1 - e^{-t/T_1}) \quad (1.2)$$

Le T_2 varie avec la structure moléculaire de l'échantillon étudié, il est plus élevé dans les solutions que dans les solides.

Le temps de relaxation transversale T_2 est caractéristique du temps de retour à l'équilibre de la magnétisation dans le plan xy (M_{xy}) (**équation 1.3**). La relaxation transversale est également appelée relaxation spin-spin car elle est la conséquence d'une interaction des spins des protons entre eux et ne fait pas intervenir de transfert d'énergie.

Chapitre 1

$$M_{xy} = M_0 e^{-t/T_2} \quad (1.3)$$

Les expériences d'IRM nécessitent un codage spatial de l'échantillon étudié. La localisation du signal dans l'espace est possible grâce à l'utilisation de gradients de champs. Le gradient correspond à une variation linéaire du champ magnétique en fonction de la position dans l'espace. Ces gradients sont appliqués dans la même direction que \vec{B}_0 mais à des fréquences plus faibles. La relation de Larmor est alors modifiée suivant l'équation 1.4.

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} (B_0 + xG_x + yG_y + zG_z) \quad (1.4)$$

Où G_x , G_y et G_z correspondent aux gradients de champ dans chacune des directions de l'espace (x,y,z).

1.1.3 Obtention du contraste en IRM

Le contraste en IRM s'exprime par différents niveaux de gris sur les images. Dans le corps humain, les différences de contraste vont apparaître en fonction des différents tissus biologiques. Le contraste va varier principalement en fonction des temps de relaxation (T_1 , T_2) et de la densité de spin des différents tissus, plus la densité de spin est élevée, plus le signal sera intense. L'expérimentateur peut définir certains paramètres de séquence qui vont permettre de faire varier le contraste sur l'image en fonction des propriétés intrinsèques de l'échantillon (T_1 , T_2 , T_2^*).

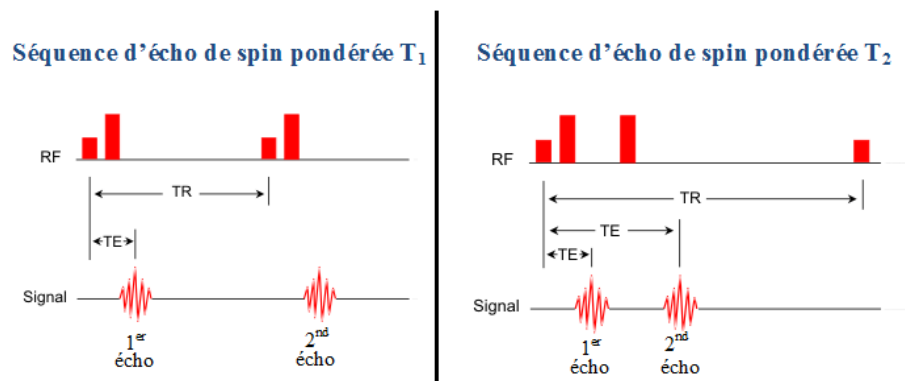


Figure 1.4 : Représentation des séquences d'écho de spin utilisées pour l'obtention d'images pondérées T_1 et T_2 [9]

Toutes les séquences d'écho de spin sont construites suivant le même schéma : application d'une première impulsion RF à 90° suivie d'une seconde impulsion RF à 180° permettant de s'affranchir du déphasage de spin lié aux inhomogénéités du champ B_0 (**figure 1.4**).

Les séquences pondérées T_1 et T_2 se différencient principalement par les paramètres de temps de répétition (TR) et de temps d'écho (TE) après l'excitation RF 90° . TR correspond au temps entre deux répétitions successives de l'impulsion RF 90° , TE correspond à l'intervalle de temps entre l'impulsion RF 90° et un écho de spin, il détermine le moment où le signal est mesuré.

Les séquences pondérées T_1 possèdent de courts TE et TR. De cette manière, les magnétisations totales des tissus possédant de courts temps de relaxation longitudinale T_1 vont avoir le temps de retourner à l'équilibre (signal brillant sur l'image RM), alors que ceux possédant de plus longs T_1 n'auront pas le temps de retourner à leur position d'équilibre (signal sombre sur l'image RM). Ainsi les milieux possédant de long T_1 (milieux aqueux) apparaîtront foncés sur l'image alors que les milieux possédant des T_1 plus courts (graisses) apparaîtront plus clairs.

Les séquences pondérées T_2 nécessitent de longs TE et TR. Un long TR permet de minimiser la relaxation longitudinale T_1 alors qu'un long TE favorise la relaxation transversale T_2 .

De ce fait les milieux possédant de long T_2 apparaîtront clairs sur l'image (milieux aqueux) alors que les milieux possédant des T_2 plus courts apparaîtront plus foncés (graisses) [10].

En comparaison aux autres techniques d'imagerie, L'IRM possède de nombreux avantages [11]:

- Une résolution spatiale élevée de l'ordre du micromètre (sur les appareils de recherche), en comparaison aux imageries nucléaires ou optiques macroscopiques dont la résolution est de l'ordre du millimètre.
- Pas d'émission de rayonnements ionisants contrairement aux scanner à rayons-X, de rayons γ ou encore d'émission de particules β , comme c'est le cas pour l'imagerie nucléaire, TEP et TEMP.
- Pas de limitation de pénétration des tissus en comparaison à l'imagerie optique dont les rayons (visible, proche infrarouge) ne pénètrent pas au-delà de quelques cm (pour le proche infrarouge), expliquant la restriction de cette modalité d'imagerie à des analyses réalisées *in vitro*, sur culture cellulaire ou à des analyses de surface.

Chapitre 1

Le contraste sur l'image va dépendre fortement des temps de relaxation des protons des molécules d'eau du tissu ou de l'échantillon observé. Dans certains cas, la différence de relaxation impliquée par une pathologie est limitée. L'IRM ne permet alors pas la différenciation du signal des différents tissus et donc l'établissement d'un diagnostic spécifique.

Afin d'augmenter le contraste en IRM, des substances superparamagnétiques (de type oxydes de fer) ou des complexes de métaux paramagnétiques exogènes appelés « agents de contraste » ont été introduits dès le milieu des années 80. La plupart des agents de contraste utilisés aujourd'hui en IRM sont des complexes formés à partir d'un cation lanthanide, le gadolinium(III). Les propriétés magnétiques intrinsèques des lanthanides font de ces agents de contraste des éléments particulièrement intéressants pour une utilisation en imagerie RM.

1.2 Les lanthanides

1.2.1 Introduction

La famille des lanthanides généralement notée Ln comporte 15 éléments métalliques dont les numéros atomiques sont compris entre 57 (Lanthane) et 71 (Lutécium). Avec le Scandium et l'Yttrium, ils sont plus communément appelés « terres rares ». Cette dénomination ne fait pas allusion à la rareté de ces éléments sur Terre puisqu'ils sont tout aussi répandus que des éléments tels que le zinc ou le cuivre et plus répandus que le plomb ou l'argent. Le qualificatif de « rare » a été attribué à ces éléments en raison de leur grande disparité sur la planète et de leur découverte progressive.

Présents dans la croûte terrestre sous formes d'oxydes de lanthanides, c'est en Chine que l'on trouve les plus grandes proportions de minerais à partir desquels sont extraits les lanthanides. Leurs propriétés chimiques très similaires rendent la purification de ces éléments assez difficile, mais aujourd'hui les techniques de séparation des lanthanides, principalement basées sur l'exclusion stérique, sont disponibles [12].

On peut également décrire les lanthanides comme étant les éléments du tableau périodique à partir desquels la couche électronique f commence à se remplir. La configuration électronique de ces éléments à l'état atomique peut être décrite telle que :



Les électrons de la couche $4f$ sont très proches du noyau et blindés par les couches pleines $5s^2$ et $5p^6$, ils sont donc relativement peu impliqués dans les liaisons chimiques. Ces éléments hautement électropositifs sont pour la plupart trivalents et possèdent l'ion Ln^{3+} comme état d'oxydation, cependant, on peut trouver le cérium à l'état d'oxydation $4+$, et le samarium, l'euporium et l'ytterbium peuvent être stables sous leur forme divalente Ln^{2+} .

La nature électropositive des lanthanides leur vaut la qualification d'acides « durs » selon la classification de Pearson. Ce caractère favorise leur coordination avec des groupements possédant des atomes électrodonneurs (O, N, Halogènes) plutôt qu'avec des atomes dits « mous » (S, P). De ce fait, les ligands constitués de groupements amine ou acide carboxylique sont le plus souvent utilisés pour la complexation des lanthanides. En règle générale, le nombre de coordination des complexes de lanthanide est 8 ou 9 en solution [13]. Dans les complexes formés avec des ligands possédants moins de fonctions coordinantes, des molécules d'eau complètent la première sphère de coordination.

En dépit d'une diminution significative de la taille des atomes avec l'augmentation du numéro atomique le long de la série des lanthanides (**tableau 1.1**), leurs propriétés chimiques sont très similaires. La diminution du rayon atomique le long de la série est connue sous le terme de « contraction des lanthanides », liée au remplissage successif de la couche électronique f le long de la série. En raison de la forme des orbitales $4f$, le blindage d'un électron par un autre est très imparfait de sorte qu'à chaque augmentation de la charge nucléaire effective, apparaît une réduction conséquente de la taille de l'ensemble de la couche $4f$.

Tableau 1.1 : Quelques propriétés des lanthanides [13]

Numéro atomique	Nom	Symbole	Configuration électronique		Rayon atomique (Å)
			Atome	M ³⁺	
57	Lanthane	La	$5d^1 6s^2$	[Xe]	1.061
58	Cérium	Ce	$4f^1 5d^1 6s^2$	$4f^1$	1.034
59	Praséodyme	Pr	$4f^3 6s^2$	$4f^2$	1.013
60	Néodyme	Nd	$4f^4 6s^2$	$4f^3$	0.995
61	Prométhium	Pm	$4f^5 6s^2$	$4f^4$	0.979
62	Samarium	Sm	$4f^6 6s^2$	$4f^5$	0.964
63	Europium	Eu	$4f^7 6s^2$	$4f^6$	0.950
64	Gadolinium	Gd	$4f^7 5d^1 6s^2$	$4f^7$	0.938
65	Terbium	Tb	$4f^9 6s^2$	$4f^8$	0.923
66	Dysprosium	Dy	$4f^{10} 6s^2$	$4f^9$	0.908
67	Holmium	Ho	$4f^{11} 6s^2$	$4f^{10}$	0.894
68	Erbium	Er	$4f^{12} 6s^2$	$4f^{11}$	0.881
69	Thulium	Tm	$4f^{13} 6s^2$	$4f^{12}$	0.869
70	Ytterbium	Yb	$4f^{14} 6s^2$	$4f^{13}$	0.858
71	Lutétiem	Lu	$4f^{14} 5d^1 6s^2$	$4f^{14}$	0.848

1.2.2 Propriétés magnétiques et optiques des lanthanides

1.2.2.1 Propriétés magnétiques

A l'exception du lanthane (La) et du lutécium (Lu), tous les lanthanides possèdent des électrons non appariés et sont donc de ce fait paramagnétiques.

Les électrons f avec leurs moments angulaires J élevés, lié à un couplage spin-orbitale fort, sont responsables des propriétés magnétiques des lanthanides.

Celles-ci varient de manière frappante d'un atome à un autre puisque les interactions inter-électroniques donnent différents états orbitaux qui changent avec le nombre d'électrons sur la couche f .

Le moment magnétique (μ_{eff}) des ions lanthanides (**tableau 1.2**) est exprimé en fonction du moment quantique angulaire total J (**équation 1.5** avec le facteur- g de Landé (g_J) donné par l'équation 1.6) [14].

$$\mu_{eff} = g_J \sqrt{J(J+1)} \quad (1.5)$$

$$\text{avec } g_J = \frac{3}{2} + \frac{S(S+1) - L(L+1)}{2J(2J+1)} \quad (1.6)$$

Tableau 1.2 : Quelques propriétés magnétiques des lanthanides [13]

Lanthanide	Configuration Ln^{3+}	État Orbital	e^- non- appariés	μ_{eff}	g_J	T_{1e} ($10^{-13}s$)
La	4 f^0	1S_0	0	0.00	0	-
Ce	4 f^1	$^2F_{5/2}$	1	2.54	6/7	0.9
Pr	4 f^2	3H_4	2	3.58	4/5	0.57
Nd	4 f^3	$^4I_{9/2}$	3	3.68	8/11	1.15
Pm	4 f^4	5I_4	4	2.83	3/5	-
Sm	4 f^5	$^6H_{5/2}$	5	0.85	2/7	0.45
Eu	4 f^6	7F_0	6	0.00	0	0.09
Gd	4 f^7	$^8S_{7/2}$	7	7.94	2	10^4 - 10^5
Tb	4 f^8	7F_6	6	9.72	3/2	2.03
Dy	4 f^9	$^6H_{15/2}$	5	10.63	4/3	2.99
Ho	4 f^{10}	5I_8	4	10.60	5/4	1.94
Er	4 f^{11}	$^4I_{15/2}$	3	9.59	6/5	2.38
Tm	4 f^{12}	3H_6	2	7.57	7/6	3.69
Yb	4 f^{13}	$^2F_{7/2}$	1	4.53	8/7	1.37
Lu	4 f^{14}	1S_0	0	0	0	-

Chapitre 1

Dans le cadre des travaux de cette thèse, ce sont les propriétés paramagnétiques des lanthanides qui nous ont intéressés.

Les propriétés paramagnétiques des lanthanides sont exploitées en RMN depuis de nombreuses années. Chaque ion Ln^{3+} va avoir un effet qui lui est propre sur les propriétés de RMN comme par exemple, la modification du temps de relaxation et du déplacement chimique des différents noyaux proximaux [15].

Le Gd^{3+} est le cation lanthanide qui possède le temps de relaxation électronique (T_{1e}) le plus long de toute la série (**tableau 1.2**) et le spin électronique le plus élevé, faisant de lui l'ion métallique le plus paramagnétique et par conséquent le cation le plus intéressant pour l'IRM. En tant qu'agent de contraste IRM, le Gd^{3+} est capable d'induire une réduction sensible du temps de relaxation T_1 et T_2 des protons des molécules d'eau du tissu environnant et donc d'augmenter le contraste sur l'image. Ce principe, et les mécanismes impliqués seront détaillés dans le paragraphe 1.3.1.

Le déplacement chimique (Δ) induit par un lanthanide paramagnétique (LIS pour « lanthanide induced shift ») sur le noyau d'un ligand complexant provient de trois mécanismes additifs (**équation 1.7**) [16,17] :

$-\Delta_d$: le déplacement chimique diamagnétique, qui correspond au déplacement chimique du noyau étudié sans la présence de l'élément paramagnétique.

$-\Delta_c$: la contribution contacte, qui résulte de la transmission d'un électron non-apparié de Ln^{3+} vers le noyau du ligand étudié.

$-\Delta_p$: l'interaction pseudo-contacte, qui résulte des interactions dipolaires entre les moments magnétiques des électrons non-appariés de l'ion Ln^{3+} et le noyau atomique étudié.

$$\Delta = \Delta_d + \Delta_c + \Delta_p \quad (1.7)$$

Comme les lanthanides (sauf le Gd^{3+}) possèdent de faibles temps de relaxation de spin électronique ($T_{1s} < 10^{-13}\text{s}$), le déplacement du signal RMN des noyaux alentours s'accompagne d'un élargissement plus au moins modéré de celui-ci. Le Gd^{3+} possède lui un T_{1s} beaucoup plus long ($T_{1s} > 10^{-10}\text{s}$), le signal RMN est alors très élargi et les pics du spectre RMN ne sont plus observables.

Grâce aux propriétés LIS des lanthanides (sauf gadolinium), ces éléments seront particulièrement intéressants pour la conception d'agents de contraste paraCEST, (principe détaillé paragraphe 1.3.2).

1.2.2.2 Propriétés optiques

Les lanthanides sont très intéressants également d'un point de vue optique. La luminescence des lanthanides est largement utilisée dans la vie courante, on retrouve ces éléments dans les écrans de téléviseurs, de téléphones, dans les panneaux photovoltaïques ou encore dans les systèmes de télécommunication par exemple. De plus, les propriétés optiques des lanthanides sont également utiles en biologie puisque ces éléments peuvent être employés pour la conception de sondes d'imagerie optique.

Les spectres d'émission de la série des lanthanides couvrent le spectre électromagnétique depuis les UVs jusqu'au proche infrarouge [18]. Certains ions lanthanide possèdent une longueur d'onde d'émission dans le visible, comme c'est le cas pour l' Eu^{3+} , le Tb^{3+} , le Sm^{3+} ou le Dy^{3+} et d'autres émettent dans le proche-infra-rouge comme le Nd^{3+} , l' Yb^{3+} ou encore l' Er^{3+} . Le La^{3+} et le Lu^{3+} ne sont pas luminescents.

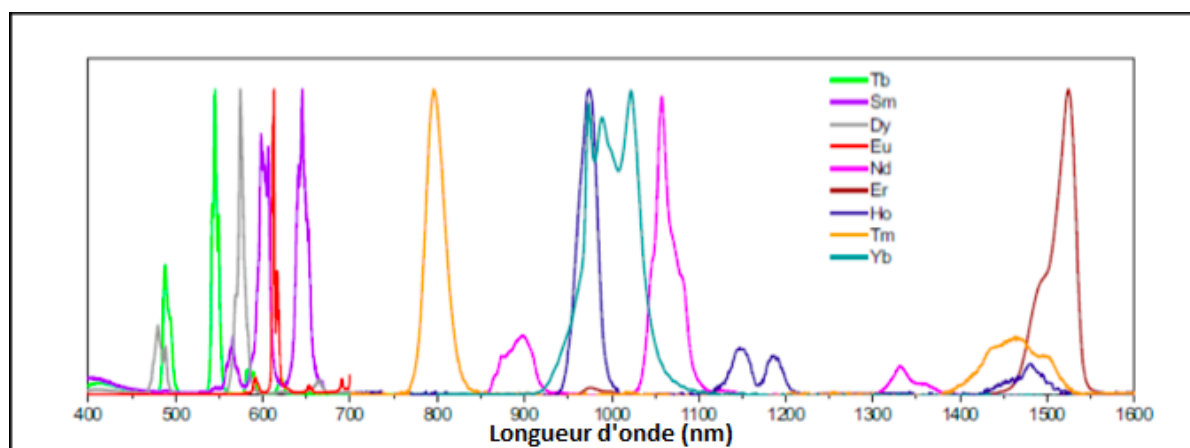


Figure 1.5 : Spectres d'émission de certains lanthanides [19,20]

La présence d'électrons sur la couche électronique f est déterminante dans les propriétés optiques des Ln. A cause du blindage des orbitales $4f$ par les orbitales $5s$ et $5p$, les niveaux d'énergie des orbitales sont bien définis et les transitions électroniques entre ces différents niveaux d'énergies sont nettes. Il en résulte de fines bandes d'émission, spécifiques aux lanthanides.

Chapitre 1

Les transitions $f-f$ étant interdites par les règles de Laporte, une excitation directe du lanthanide produirait une faible luminescence [21]. C'est pour cette raison que les lanthanides nécessitent d'être excités de manière indirecte, c'est ce que l'on appelle l' « effet d'antenne ». L'ion lanthanide doit alors être conjugué à un sensibilisateur, le lanthanide est généralement coordonné à un chélateur comportant un chromophore.

De cette manière, la lumière d'excitation est absorbée par le chromophore, l'énergie ainsi absorbée est transmise au lanthanide et réémise par celui-ci sous forme de luminescence [22-25].

1.2.3 Toxicité des lanthanides

Dans le cadre de la conception d'agent de contraste à base de lanthanides, la toxicité de ces éléments est un facteur important à considérer. Les principaux effets cytotoxiques causés par les lanthanides proviennent de la similarité des rayons ioniques de ces éléments avec la taille du cation Ca^{2+} . Les ions lanthanides trivalents, en particulier le Gd^{3+} , peuvent se comporter comme des compétiteurs de l'ion Ca^{2+} et de ce fait inhiber de nombreux processus physiologiques calcium-dépendants (contraction du muscle cardiaque, transmission de l'influx nerveux, coagulation du sang, etc.) [26-29]. Dans les conditions physiologiques, les lanthanides peuvent également précipiter dans certains organes (principalement les poumons et le foie) et entraîner la nécrose de ceux-ci [30-32].

Pour limiter la toxicité de l'ion libre, il est complexé à des ligands chélatants qui encapsulent le métal et empêchent sa libération. Ainsi, la dose létale LD_{50} pour une injection intraveineuse chez la souris est de 10.6 mmol/kg pour Gd-DOTA (H_4DOTA = acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique) alors qu'elle est de 0.35 mmol/kg pour GdCl_3 injecté dans les mêmes conditions [33].

Les ligands de choix permettant une complexation forte des lanthanides sont les ligands poly (aminocarboxylates) tels que des dérivés du DOTA ou du DTPA (H_5DTPA = acide diéthylènetriamine-pentaacétique) (figure 1.6).

Afin d'éviter le relargage *in-vivo* des lanthanides, les complexes doivent justifier d'une bonne stabilité thermodynamique et inertie cinétique, ce point sera explicité plus en détail dans le chapitre 3.

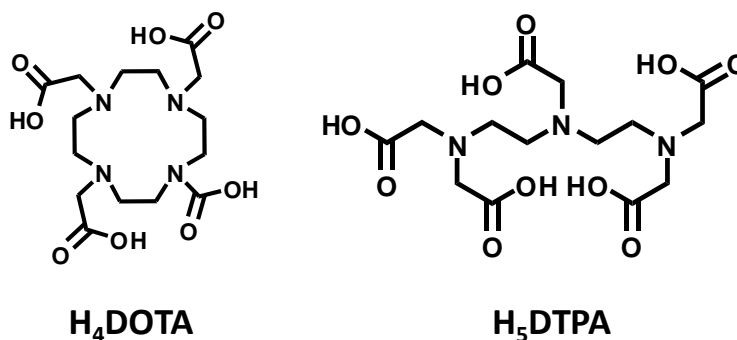


Figure 1.6 : Structures moléculaires du H₄DOTA et du H₅DTPA

1.3 Les agents de contraste pour l'IRM

Bien que l'IRM ait été au départ développé pour permettre des investigations morphologiques de manière non invasive, l'emploi d'agents de contraste peut permettre d'augmenter la sensibilité et/ou la spécificité de la technique. Traditionnellement, les agents de contraste IRM contribuent à améliorer des informations au niveau anatomique. Néanmoins, avec l'émergence de l'imagerie moléculaire, les sondes d'imagerie peuvent également être élaborées de manière à apporter des informations biologiques à l'échelle moléculaire.

Les sondes IRM qui font l'objet du présent manuscrit sont principalement des complexes à base d'ions Ln³⁺ et sont destinées à l'imagerie moléculaire. Selon le mécanisme de fonctionnement, deux types d'agents de contraste sont présentés dans le cadre de ces travaux : les agents de contraste T₁ et paraCEST.

1.3.1 Les agents de contraste T₁

1.3.1.1 Complexes de Gd³⁺

Les agents de contrastes les plus utilisés actuellement sont des agents de contraste dits T₁.

Ils ont pour effet de diminuer principalement le temps de relaxation longitudinal (T₁) des protons des molécules d'eau environnantes (bien qu'ils aient également un effet sur le T₂) résultant en un contraste positif sur les images pondérées T₁ des expériences d'IRM. Ces composés sont à base d'ions métalliques paramagnétiques comme le Gd³⁺ ou le Mn²⁺ chélatés par des ligands pour former des complexes thermodynamiquement stables et cinétiquement inertes.

Aujourd'hui, les agents de contraste à base du Gd³⁺ sont de loin les plus couramment utilisés ; des complexes commercialisés pour une utilisation en clinique sont représentés en **figure 1.7**.

Chapitre 1

En général, les chélates macrocycliques ont une meilleure stabilité thermodynamique et surtout une inertie cinétique supérieure de plusieurs ordres de grandeur à celle de leurs analogues linéaires. Par exemple, la constante de stabilité thermodynamique du Gd-DOTA (Dotarem[®]) est de $\log K = 25.30$ [34], vs. $\log K = 22.46$ [35] pour le Gd-DTPA (Magnevist[®]).

Leur inertie cinétique, caractérisée par les temps de demi-vie de dissociation de 7.9×10^{-3} s pour le complexe Gd-DTPA et de 96,2 h pour le composé Gd-DOTA [36] ($[H]^+ = 0.1$ M) montrent clairement la supériorité d'inertie des complexes formés à partir de ligands macrocycliques. L'inertie cinétique combinée à la stabilité thermodynamique est le meilleur prédictor de la non-toxicité *in-vivo* des complexes métalliques.

Après une injection intraveineuse, ces agents se distribuent rapidement dans l'espace extracellulaire et sont éliminés par voie rénale suivant des temps de demi-vie de 1-2 h [37].

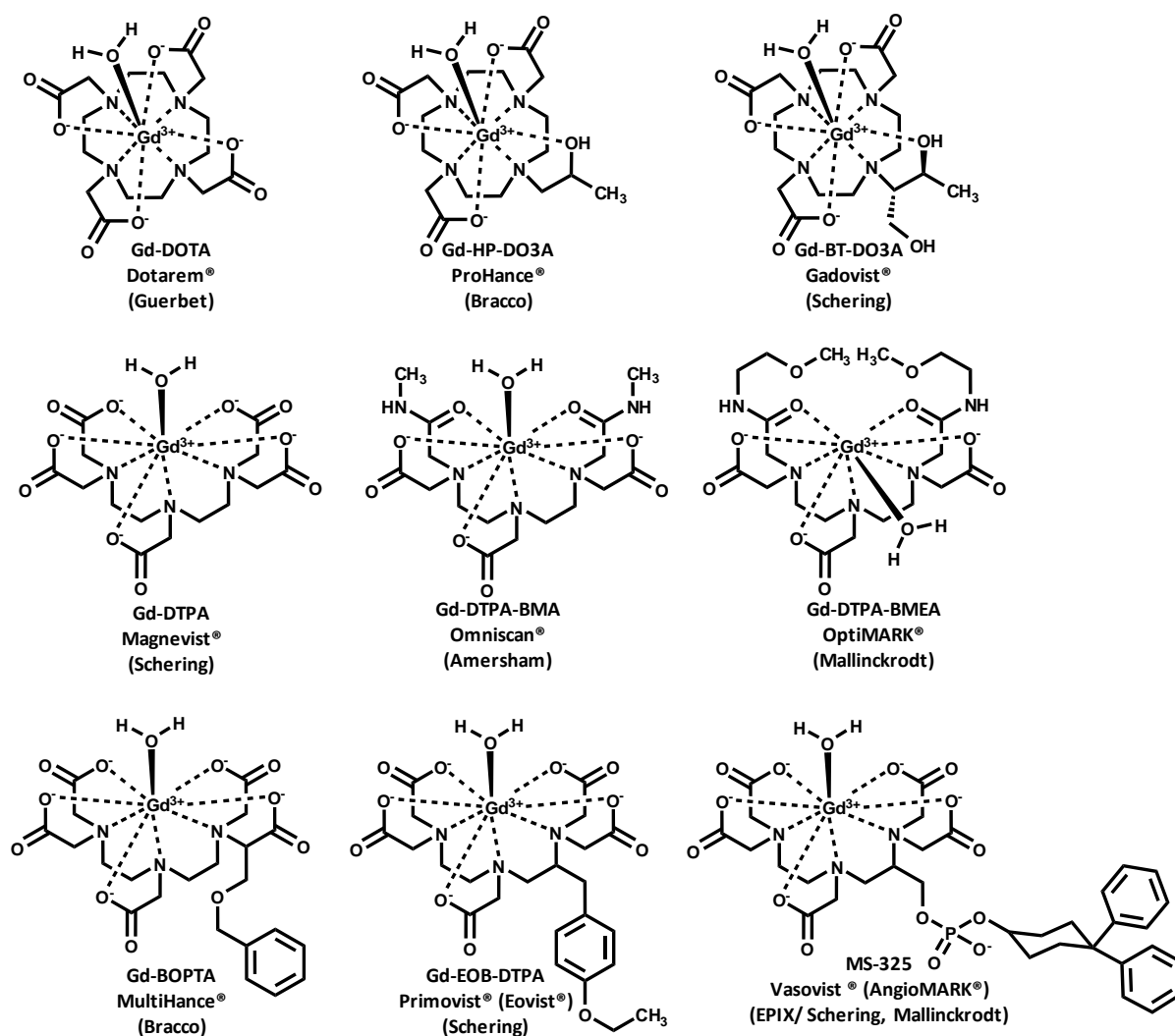


Figure 1.7 : Agents de contraste utilisés en clinique [38]

1.3.1.2 Complexes de Mn^{2+}

La découverte au milieu des années 2000 de la fibrose systémique néphrogénique (FSN) décrite chez des patients insuffisants rénaux ayant subi une injection d'agent de contraste à base de gadolinium pousse la recherche à développer de nouveaux agents de contraste pour l'IRM plus sûrs. Une alternative à l'ion Gd^{3+} est l'utilisation de métaux de transition, parmi eux, le Mn^{2+} présente un potentiel en IRM très intéressant.

Possédant 5 électrons non appariés et une relaxation électronique lente, le manganèse permet une forte relaxation des protons de l'eau qui l'entourent, engendrant ainsi un contraste positif en images pondérées T_1 . Le principal avantage du manganèse se trouve au niveau de ses propriétés biologiques. En effet, le Mn^{2+} (contrairement au Gd^{3+}) est un ion endogène présent en relativement grande concentration à travers le corps humain ($0.5-1.2 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ dans le serum) et est impliqué dans de nombreux processus biologiques. On le retrouve comme cofacteur de nombreuses enzymes telle que la glutamine synthétase présente dans le cerveau et impliquée dans la neurotransmission [39]. En dépit du rôle biologique important du Mn^{2+} , une surexposition à cet ion peut entraîner chez l'homme de graves dommages neurologiques [40]. Par conséquent, pour assurer sa non-toxicité, l'ion Mn^{2+} doit être utilisé comme agent de contraste sous forme complexée. Un seul agent de contraste à base de manganèse a été autorisé en clinique, le Teslascan® ($[Mndpdp]^{4-}$, $dppd=N,N'$ -dipyridoxyléthylènediamine- N,N' -diacétate-5,5'-bis(phosphate)) [41], aujourd'hui retiré du marché. Dans ce complexe, aucune molécule d'eau n'est coordonnée au centre métallique mais le relargage progressif de l'ion Mn^{2+} *in-vivo* conduit à une forte augmentation de la vitesse de relaxation des protons d'eau. Certains des ligands utilisés pour complexer l'ion Mn^{2+} dans le cadre de la conception d'agents de contraste sont représentés en **figure 1.8** [42-45].

Etant donné la charge plus petite et le nombre de coordination plus bas du Mn^{2+} , la stabilité thermodynamique de ses complexes est inférieure à celle des chélates analogues du Gd^{3+} .

De plus, l'inertie cinétique est également difficile à atteindre pour les chélates de Mn^{2+} (cf. Chapitre 6). Contrairement aux complexes de Gd^{3+} très largement étudiés, les constantes de stabilités thermodynamiques et les propriétés cinétiques des complexes de Mn^{2+} sont relativement peu décrites.

Chapitre 1

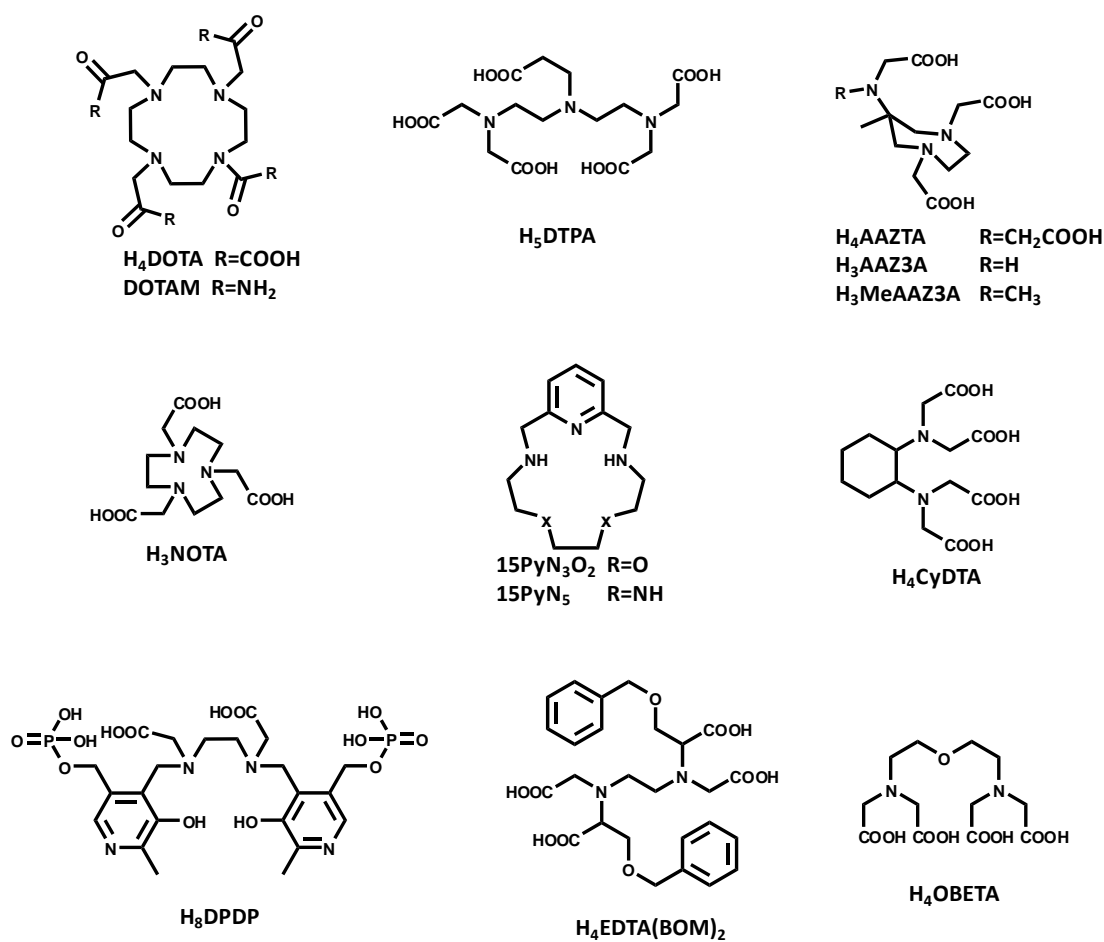


Figure 1.8 : Structure moléculaire de certains ligands utilisés pour la complexation du Mn²⁺ [44,45]

1.3.1.3 Relaxivité : Théorie et mécanisme

La présence d'un ion paramagnétique en solution aqueuse va induire une augmentation de la vitesse de relaxation longitudinale $1/T_1$ et transversale $1/T_2$ des protons des molécules d'eau. La relaxation nucléaire dans des solutions diluées des complexes paramagnétiques est décrite par les équations de Solomon-Bloembergen-Morgan qui relient donc les propriétés microscopiques des complexes à leur efficacité en tant qu'agent de contraste pour l'IRM [46-50]. L'efficacité d'un agent de contraste est donnée par sa relaxivité, r_1 , qui exprime l'augmentation paramagnétique de la vitesse de relaxation longitudinale ($1/T_1$) par 1mM d'agent de contraste (r_1 exprimé en $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$). La vitesse de relaxation observée $1/T_{1,\text{obs}}$ sera alors la somme des vitesses de relaxations diamagnétique ($1/T_{1,\text{d}}$) et paramagnétique ($1/T_{1,\text{p}}$) (équation 1.12).

$$\frac{1}{T_{1,obs}} = \frac{1}{T_{1,d}} + \frac{1}{T_{1,p}} \quad (1.8)$$

Le terme paramagnétique $1/T_{1,p}$ qui représente l'augmentation de la vitesse de relaxation liée à la présence de l'ion paramagnétique est directement proportionnel à la concentration en ion paramagnétique (c_M), la relaxivité r_1 peut alors être définie comme dans l'équation **1.9**.

$$r_1 = \frac{1}{T_{1,p}} \times \frac{1}{c_M} \quad \text{mM}^{-1}\text{s}^{-1} \quad (1.9)$$

avec $M = \text{Gd}^{3+}, \text{Mn}^{2+}$

L'effet de relaxation d'un complexe d'ion paramagnétique est le résultat des interactions dipolaires entre le spin électronique du cation et le spin nucléaire des protons de l'eau et provient de différents mécanismes : le mécanisme de sphère interne (IS), le mécanisme de sphère externe (OS) et dans certains cas le mécanisme de seconde sphère (SS) (**équation 1.10**).

$$r_1 = r_1^{IS} + r_1^{OS} + r_1^{SS} \quad (1.10)$$

Le mécanisme de sphère externe est relié aux molécules d'eau qui diffusent autour de l'ion paramagnétique, alors que le mécanisme de sphère interne provient des molécules d'eau directement coordonnées au centre métallique et qui sont en échange avec les molécules d'eau environnantes. Le mécanisme de seconde sphère provient des molécules d'eau qui ne sont pas directement liées au centre paramagnétique, mais qui restent tout de même assez proche (dans une deuxième sphère de coordination) liées par des liaisons hydrogène au ligand ou à la molécule d'eau directement coordonnée au métal. Cette dernière contribution n'est pas toujours importante et reste beaucoup plus difficile à décrire précisément. Par conséquent, elle est souvent négligée dans l'analyse de la relaxivité des complexes.

Chapitre 1

Etant donné que le mécanisme de sphère externe dépend de la diffusion aléatoire des molécules d'eau autour de l'agent de contraste, il est par conséquent difficile de le moduler. Le mécanisme de sphère interne est le mécanisme le plus efficace et le plus influent pour la relaxivité. Modifier les paramètres régissant ce mécanisme peut permettre d'augmenter l'efficacité (la relaxivité) d'un agent de contraste. Les paramètres modulant la relaxivité liés au mécanisme de sphère interne sont donnés par l'équation **1.11**.

$$r_1^{IS} = \frac{cq}{55.5} \frac{1}{T_{1m} + \tau_m} \quad (1.11)$$

Avec c , la concentration molaire, q , le nombre de molécules d'eau directement coordonnées au centre métallique, τ_m , le temps de vie d'une molécule d'eau dans la sphère interne du complexe (égal à l'inverse de la constante de vitesse d'échange, $1/k_{ex}$) et T_{1m} , le temps de relaxation des protons des molécules d'eau coordonnées (**figure 1.9**).

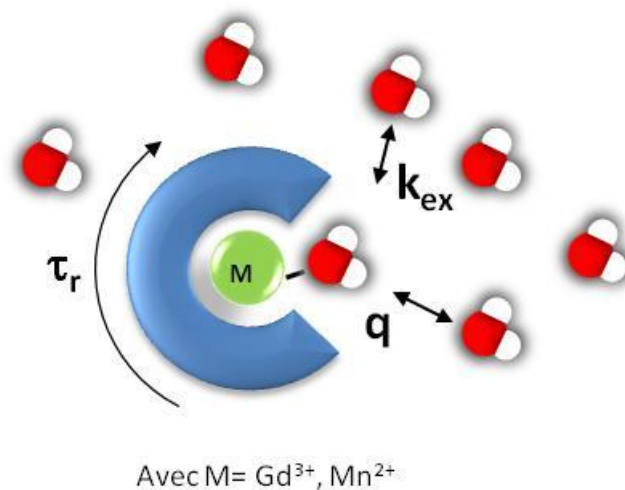


Figure 1.9 : Représentation schématique des paramètres influençant la relaxivité IS d'un agent de contraste T₁

Les paramètres qui influencent la relaxivité de sphère interne sont définis comme suit :

q, le nombre de molécules d'eau coordonnées (nombre d'hydratation) : r_1^{IS} est directement proportionnel à q . Les agents de contraste commerciaux possèdent tous une molécule d'eau coordonnée au centre métallique. Augmenter le nombre d'hydratation permettrait une augmentation significative de la relaxivité, mais peut impliquer une diminution de la stabilité du complexe relative à la perte d'une (ou plusieurs) groupe donneur au niveau du ligand. La modification de ce paramètre (q) nécessite de garder l'équilibre entre efficacité et stabilité afin d'obtenir une relaxivité satisfaisante tout en évitant la toxicité liée au relargage de l'ion métallique libre.

k_{ex} , la constante de vitesse d'échange : La constante de vitesse d'échange entre la molécule d'eau coordonnée au métal et les molécules d'eau du solvant environnant, k_{ex} , possède une valeur optimale qui dépend de la dynamique de rotation du complexe mais aussi du champ magnétique [51-53]. En terme général, si la constante de vitesse d'échange est trop faible, l'effet paramagnétique ne sera pas convenablement propagé aux protons des molécules d'eau de la solution. A l'inverse, si k_{ex} est trop rapide, la molécule d'eau coordonnée n'aura pas le temps de profiter de l'effet de l'ion paramagnétique.

τ_r , le temps de corrélation rotationnelle : Le τ_r traduit la dynamique de rotation du complexe en solution. Il est directement lié à la taille du complexe lui-même et à la flexibilité du système, quand il s'agit d'un complexe macromoléculaire. C'est le paramètre qui limite la relaxivité des agents de contraste commerciaux [51]. En général, τ_r va augmenter avec la taille des molécules, il s'agit alors d'un paramètre modulable pour augmenter la relaxivité. De ce fait, les complexes formés avec des ligands de poids moléculaire élevés ou des macromolécules telles que les peptides [54,55], les micelles [56,57] ou encore les dendrimères [56,58,59] auront une relaxivité élevée.

Les temps de relaxation électronique (T_{1e} et T_{2e}) : Les temps de relaxation longitudinale et transversale du spin électronique du Gd^{3+} influence tous deux la relaxivité. Il reste cependant difficile de corrélérer leur valeur avec la structure du ligand. Ces deux paramètres sont également dépendants du champ magnétique B_0 et ont une importance primordiale à bas champs. Pour des champs magnétiques plus élevés comme les champs utilisés en IRM clinique, la relaxation électronique a moins d'influence pour la relaxivité.

Chapitre 1

La distance M-H : La diminution de la distance entre le centre métallique paramagnétique (M) et le proton de la molécule d'eau qui lui est coordonné résulte en une augmentation très importante de la relaxivité (la distance rentre en puissance 6, $1/r^6$, dans l'équation qui exprime la relaxivité).

Ainsi une diminution de la distance Gd-H de 0.1Å induit une augmentation de relaxivité de 20% alors qu'une diminution de 0.2Å correspond à une augmentation de relaxivité de 50% [53]. Bien que la distance M-H soit un paramètre important pour les analyses de relaxivité, il est relativement difficile à déterminer expérimentalement et il reste très peu modulable.

D'après la théorie SBM, l'optimisation des paramètres mentionnés ci-dessus pourraient conduire à des relaxivités de l'ordre de $100\text{mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ à 20MHz alors que les complexes de Gd^{3+} commerciaux ont une relaxivité de $4\text{-}5\text{mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ dans les mêmes conditions. Les paramètres q , k_{ex} et τ_r sont les plus faciles à déterminer et sont aussi les plus facilement modifiables par les modifications structurales du ligand. Prendre en compte ces paramètres permet de concevoir, de manière rationnelle, des agents de contraste T_1 dotés de relaxivités élevées.

1.3.2 Les agents de contraste ParaCEST

Une nouvelle catégorie d'agents de contraste IRM apparait dans les années 2000 : les agents CEST ou paraCEST. Contrairement aux agents de contraste à base de gadolinium ou de manganèse, ce n'est pas la modification du temps de relaxation des protons de l'eau qui va entraîner l'apparition d'un contraste, mais les effets de l'application d'une impulsion de pré-saturation sur un système avec des protons en échange chimique.

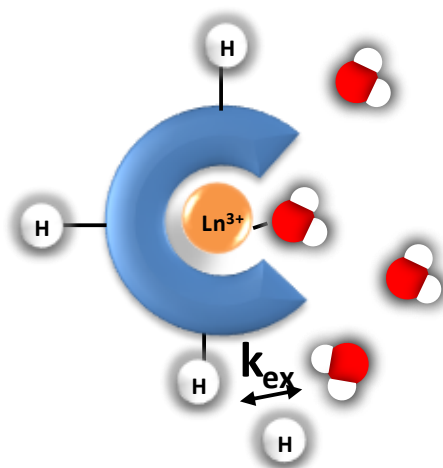


Figure 1.10 : Représentation schématique des agents PARACEST impliquant un échange chimique entre un proton du complexe et un proton de la molécule d'eau

CEST est l'acronyme de l'anglais Chemical Exchange Saturation Transfer (Transfert de Saturation par Echange Chimique). L'échange chimique correspond dans ce cas à l'échange entre un proton labile de l'agent de contraste et les protons des molécules d'eau du solvant. Il est donc nécessaire que l'agent de contraste possède des fonctions chimiques avec des protons labiles telles que les fonctions $-NH$, $-OH$, $-SH$, ou encore H_2O présent dans la première sphère de coordination du métal (**figure 1.10**). Pour que l'effet CEST puisse être observé, il faut que l'échange chimique entre les deux environnements magnétiques distincts ne soit pas trop rapide. En effet, la constante de vitesse d'échange des protons (k_{ex}) doit être inférieure à la différence des déplacements chimiques des deux systèmes (**équation 1.16**).

$$\Delta\omega \geq k_{ex} \quad (1.16)$$

Pour un système remplissant ces conditions, le mécanisme du transfert de saturation par échange chimique est représenté en **figure 1.11**, où les deux environnements en échange chimique sont notés A et B. En RMN ou IRM, l'intensité du signal est proportionnelle à la magnétisation suivant l'axe z, donc l'application d'une impulsion de pré-saturation va avoir pour effet de réduire l'intensité du signal voir même de le faire disparaître si la saturation est totale.

Chapitre 1

L'application d'une impulsion de pré-saturation sur le système B va modifier la distribution de spin de ce système. Dans le cas où la relaxation des protons du système B est plus rapide que l'échange chimique avec le système A, les spins excités par la pré-saturation vont retourner à leur état d'équilibre décrit par la distribution de Boltzmann et il n'y aura pas d'effet visible sur le signal RMN des spins de A. En revanche si l'échange chimique entre les systèmes A et B est plus rapide que la relaxation du système B, les densités de spins vont se rééquilibrer entre les états excités et d'équilibres des deux systèmes, provoquant une altération de la distribution de spin du système A et, une réduction de sa magnétisation. De ce fait, la pré-saturation va entraîner la diminution de l'intensité du signal du système B mais aussi celle du système A provoquée par le transfert de saturation [60].

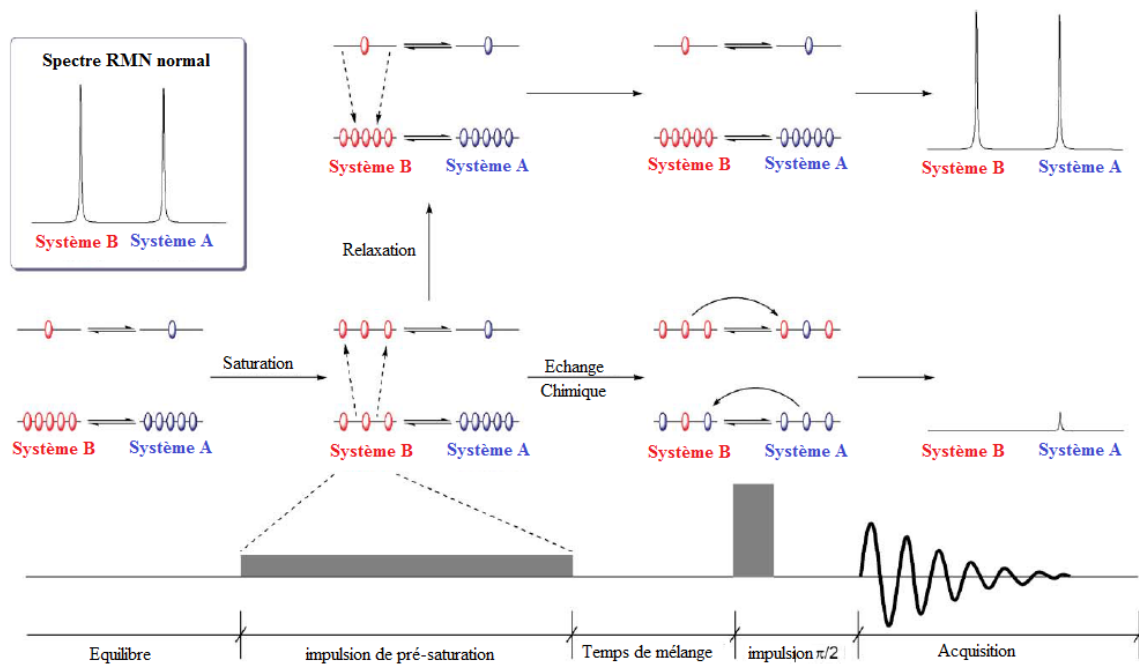


Figure 1.11 : Représentation schématique de l'expérience CEST [60]

L'effet CEST peut être décrit par l'équation 1.17 [61] :

$$\%CEST = \frac{M_S}{M_0} = \frac{1}{1+k_{ex} x_{CA} T_1} + \left[\frac{k_{ex} x_{CA} T_1}{1+k_{ex} x_{CA} T_1} \right] \exp \left[-\frac{1+k_{ex} x_{CA} T_1}{T_1} \times t_{sat} \right] \quad (1.17)$$

M_S et M_0 représentent l'intensité du signal de l'eau pendant et avant la saturation appliquée à une fréquence donnée, k_{ex} correspond à la constante de vitesse d'échange des protons des deux systèmes, T_1 est le temps de relaxation longitudinale, t_{sat} correspond au temps de saturation et x_{CA} est le rapport entre la concentration en proton labile de l'agent de contraste et la concentration en proton labile du solvant.

Les premiers exemples d'agents de contraste CEST exogènes de la littérature sont présentés par Balaban et ses collaborateurs en 2000. L'effet CEST de nombreuses petites molécules diamagnétiques telles que des sucres, des acides aminés ou encore des dérivés de l'acide barbiturique est mis en évidence [62,63]. Cette étude a démontré que les protons liés aux azotes des fonctions amine ou amide et des groupes guanidinium sont très efficaces pour diminuer l'intensité du signal de l'eau dans le cadre d'un transfert de saturation. Ces molécules diamagnétiques possèdent des effets CEST à des déplacements chimiques faibles, très proches du signal de l'eau (allant de 1 à 6.3ppm) et présentent une dépendance en fonction du pH et de la température. Par exemple, l'acide barbiturique montre un effet CEST à 5ppm pour des concentrations allant de 15 à 125 mM (figure 1.12).

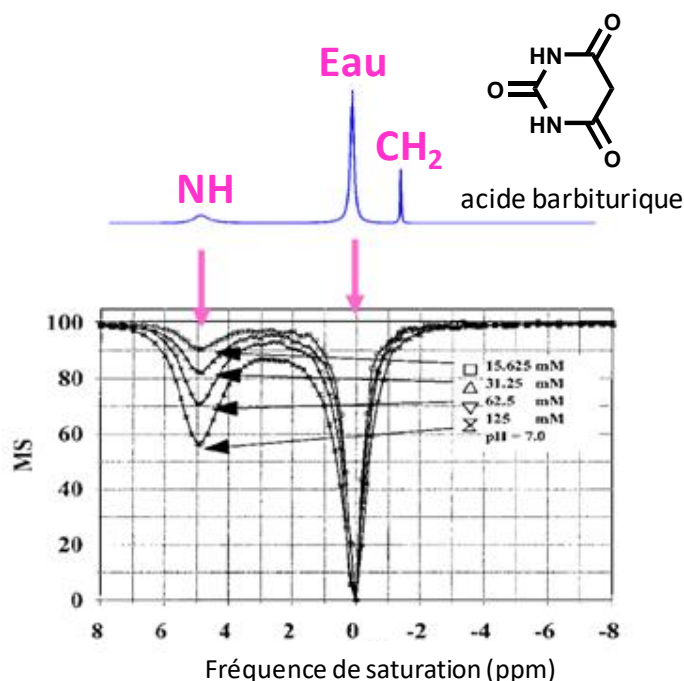


Figure 1.12 : Spectre CEST de l'acide barbiturique [62]

Chapitre 1

D'autres petites molécules diamagnétiques ont montré leur intérêt comme agent de contraste CEST, comme l'Ipoamidol, (utilisé comme produit de contraste pour l'imagerie par rayons X), dont les groupements hydroxyle permettent la création d'une image CEST [64].

L'effet CEST peut également être obtenu à partir de petites molécules endogènes telle que le glycogène, on parle alors de glycoCEST. Le glycogène qui est le produit de la métabolisation du glucose, possède deux effets CEST (à 0.7 et 1.2ppm) provenant des groupements hydroxyle de la molécule [65].

Le point commun de ces molécules diamagnétiques qu'elles soient endogènes ou exogènes est qu'elles possèdent des effets CEST proches du signal de l'eau à des déplacements chimiques $\Delta\omega \leq 5\text{ppm}$.

Ce faible déplacement chimique est un des facteurs limitant pour l'observation de l'effet CEST. Plus $\Delta\omega$ sera grand, plus les échanges rapides seront permis, de ce fait, l'efficacité de l'effet CEST peut être augmentée par la maximisation de $\Delta\omega$. Comme nous l'avons détaillé dans le paragraphe 1.2.2, les lanthanides paramagnétiques possèdent la propriété d'induire une augmentation des déplacements chimiques des noyaux environnants (LIS).

Ainsi, des complexes d'ions Ln^{3+} paramagnétiques peuvent être employés pour augmenter considérablement le déplacement chimique des protons dans leurs complexes et favoriser ainsi l'effet CEST, on parle alors d'agent paraCEST.

Les premiers exemples d'agent de contraste paraCEST sont présentés par D. Sherry et ses collaborateurs (EuDOTAM) [66] et par l'équipe de S. Aime (EuDOTAMGly) [67].

Il s'agit des complexes d'euprium(III) comme EuDOTAMGly pour lesquels la molécule d'eau coordonnée au centre métallique donne un effet CEST très éloigné du signal de l'eau. Le déplacement chimique des protons échangeables est ici 10 fois supérieur au proton labile $-\text{NH}$ de l'acide barbiturique (**figure 1.13**). La variation du lanthanide des complexes DOTAMGly permet d'obtenir des effets CEST allant de -720 ppm pour le Dy^{3+} à +500ppm pour le Tm^{3+} [68].

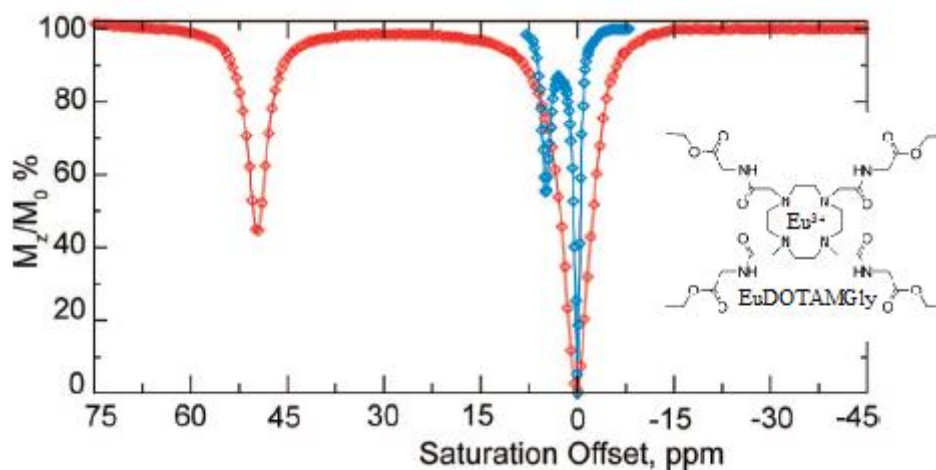


Figure 1.13: Superposition à la même échelle des spectres CEST de l'acide barbiturique (bleu) et de EuDOTAMGly (rouge) [69]

En ce qui concerne les agents paraCEST, l'effet CEST peut être dû aux protons de la molécule d'eau qui est directement coordonnée au centre métallique de l'agent de contraste, mais également aux protons labiles présents sur le ligand.

Outre le fait que l'effet CEST soit dépendant de la température et du pH, ce qui promulgue un intérêt conséquent pour imager le milieu biologique, un principal avantage de l'imagerie CEST face à l'imagerie T_1 est qu'elle soit activable à la volonté de l'opérateur. En effet, ces agents de contraste peuvent être « allumés » et « éteints » à volonté en appliquant et stoppant l'impulsion de pré-saturation ou simplement en changeant la fréquence de celle-ci. De ce fait, un composé comportant plusieurs sites d'échange pourra donner des propriétés CEST différentes en fonction de la fréquence de saturation appliquée.

De plus, de part la similitude au niveau des propriétés chimiques le long de la famille des lanthanides, les complexes formés à partir du même ligand mais de différents lanthanides peuvent permettre, du fait du déplacement chimique induit par l'ion lanthanide, de moduler la fréquence d'activation de l'effet CEST. Ainsi plusieurs agents paraCEST peuvent être administrés simultanément et chacun d'entre eux peut être activé séparément par l'application de la fréquence de saturation appropriée [70-73].

1.4 Imagerie moléculaire et agents de contraste responsifs

Alors que l'IRM a longtemps été dédiée à une imagerie anatomique et fonctionnelle, l'imagerie moléculaire IRM émerge comme étant une méthode spécifique pour la détection de processus biologiques au niveau moléculaire. Cette nouvelle forme d'imagerie aide à la compréhension et la rationalisation des paramètres biochimiques impliqués dans des processus pathologiques et pourrait permettre l'établissement de diagnostics précoces. Un domaine important de l'imagerie moléculaire implique la détection *in-vivo* des paramètres physicochimiques des tissus tels que la concentration en ion, la température, le pH, l'état redox, l'activité enzymatique, etc.[74,75]. Contrairement à l'imagerie anatomique, l'imagerie moléculaire requiert l'utilisation d'un agent de contraste. Ces agents de contrastes, appelés « intelligents », « activables » ou encore « responsifs », doivent être spécifiques des processus biologiques que l'on souhaite visualiser. L'utilisation de ces agents de contraste dit « intelligents » doit pouvoir permettre un changement du contraste sur les images pour visualiser le processus biologique ciblé.

Dans la suite de ce paragraphe nous effectuerons un rapide état de l'art concernant les agents de contraste « intelligents » à base de complexes de lanthanides, mis au point pour l'IRM T₁ et paraCEST. Depuis une dizaine d'années, de nombreux exemples d'agents de contraste intelligents ont été décrits pour la détection des cations métalliques endogènes comme le Ca²⁺ [76-79], le Cu⁺²⁺ [80,81] ou le Zn²⁺ [82-84], le pH [67,85], la température ou encore des neurotransmetteurs [86]. Ici, nous nous intéresserons plus particulièrement aux agents de contraste responsifs pour la détection de l'activité enzymatique.

1.4.1 Agents responsifs pour la détection de l'activité enzymatique

De part leur rôle essentiel dans de nombreux processus biochimiques tant physiologiques que pathologiques, les enzymes constituent une cible de choix pour l'imagerie moléculaire. La présence, l'absence d'une enzyme ou même la modification de la concentration et de l'activité de celle-ci *in-vivo*, peut être responsable d'un état pathologique, les enzymes sont alors les biomarqueurs critiques de différentes maladies. Imager en temps réel l'activité des enzymes *in-vivo* est un moyen puissant pour le diagnostic et la compréhension de la fonction de celle-ci lors d'un processus physiologique ou du développement d'une maladie.

La détection de l'activité enzymatique est particulièrement bien adaptée à l'IRM puisque le caractère catalytique de la réaction enzymatique va permettre une activation de l'agent de contraste même à de faible concentration d'enzyme et dépasser ainsi l'inconvénient de la faible sensibilité de la technique.

1.4.1.1 Agents de contraste T_1

La plupart des agents de contrastes T_1 conçus pour la détection enzymatique provoquent une modification du signal de RM au contact de l'enzyme grâce à la modification du nombre d'hydratation (q) ou du temps de corrélation rotationnelle (τ_r) du complexe, qui se traduit en un changement de relaxivité.

Le premier exemple de détection de l'activité enzymatique par un agent de contraste T_1 -responsif présenté par Meade et ses collaborateurs consiste en une modification de q par l'activité d'une enzyme [87-89]. Cet agent de contraste, activé par l'action de la β -galactosidase, est constitué d'un chélate de gadolinium(III) de type DO3A, dont 8 des 9 sites de coordination complexent l'ion métallique, et d'un résidu β -D-galactopyranose substrat de la β -galactosidase dont le positionnement par rapport au complexe bloque l'accès à une molécule d'eau sur le dernier site de coordination du complexe.

De part l'absence de molécule d'eau coordonnée sur le complexe, l'agent de contraste a une relaxivité faible, et est dans sa configuration inactive. Sous l'action de la β -galactosidase, le substrat galactopyranose est coupé, libérant ainsi l'accès à une molécule d'eau dans la première sphère de coordination (**figure 1.14**). Cet agent de contraste démontre ainsi une augmentation de 20% de la relaxivité après action de la β -galactosidase.

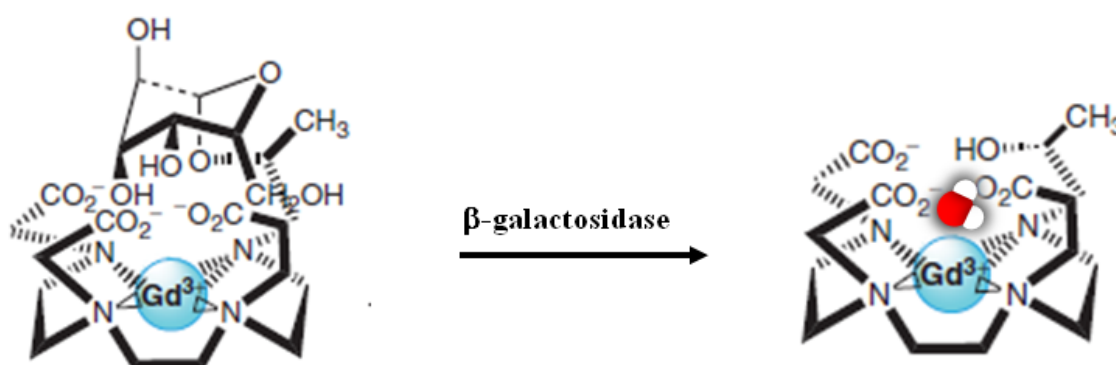


Figure 1.14 : Représentation de l'activation enzymatique de l'agent de contraste [74]

Chapitre 1

Dans un autre exemple de modification de relaxivité par modulation du nombre de molécules d'eau coordonnées, le chélate de Gd^{3+} de type DO3A est relié au substrat de la β -glucuronidase par le biais d'un espaceur auto-immolable.

La coupure du substrat par l'enzyme provoque une cascade électronique induisant l'autodestruction de l'espaceur auto-immolable. La structure moléculaire de l'agent de contraste ainsi modifiée donne place à un nouveau groupement de coordination sur le centre métallique. Il y a alors une diminution du nombre de molécules d'eau q entraînant une baisse de la relaxivité [90].

Le temps de corrélation rotationnelle (τ_r) qui est intrinsèquement lié à la taille ainsi qu'à la flexibilité de la molécule, est un autre paramètre qui est communément utilisé pour moduler la relaxivité d'un agent de contraste. Les enzymes telles que les transférases ou les oxydoréductases, sont capables de catalyser la formation de liaisons chimiques intermoléculaires, induisant la formation d'agrégats ou des phénomènes d'oligomérisation. Dans les deux cas il en résulte une augmentation de la taille de l'agent de contraste provoquant une augmentation du τ_r et donc de la relaxivité.

Dans le cas de l'hydroxytyramide-DOTA(Gd) (**figure 1.15**), la polymérisation de l'agent de contraste par l'action de peroxydases va augmenter le temps de corrélation rotationnelle et causer la diminution du temps de relaxation T_1 de l'agent de contraste [91].

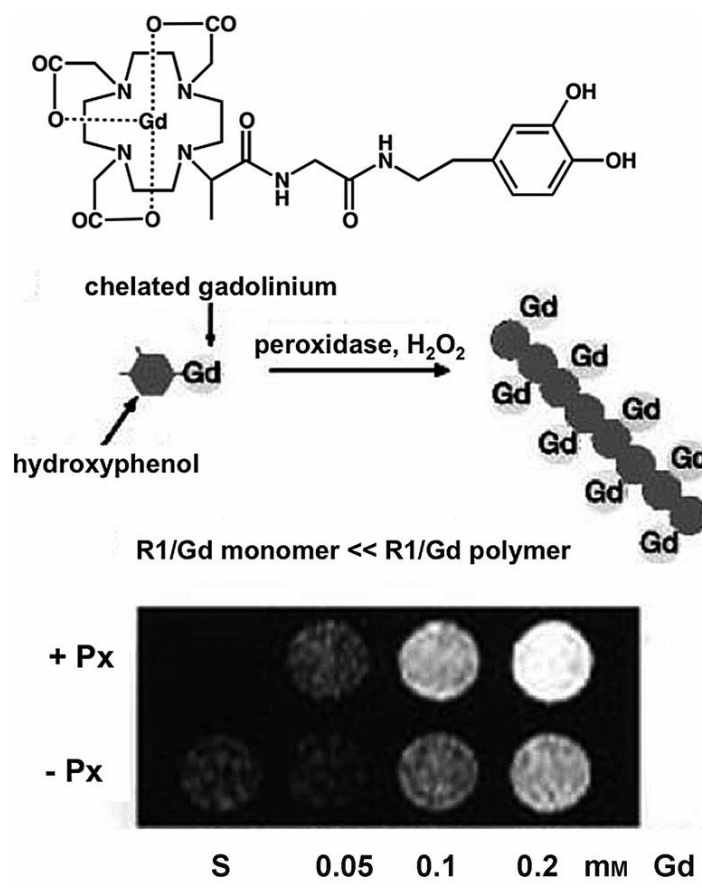


Figure 1.15 : Représentation schématique de la polymérisation du composé hydroxytyramide-DOTA(Gd) par la peroxydase et images obtenues par IRM à différentes concentrations de l'agent de contraste en présence (+Px) et absence (-Px) de peroxydase [91,92]

Dans un autre exemple, l'activité des estérases clive les acides stéariques présents sur la structure chimique d'un complexe de Gd^{3+} , donnant lieu à une polymérisation spontanée de l'agent de contraste et une diminution du temps de relaxation T_1 [93].

Les enzymes peuvent également provoquer des changements au niveau de la structure des agents de contraste, favorisant la liaison de ceux-ci avec des macromolécules comme des protéines. De telles liaisons impliquent une augmentation de la taille globale de l'agent de contraste, induisant une augmentation du τ_r et donc de la vitesse de relaxation $1/T_1$.

Par exemple, l'activité de l'alcaline phosphatase peut convertir un ester de phosphate en alcool sur un chélate de gadolinium(III), permettant à l'agent de contraste de se lier de manière non covalente à une protéine [94].

Chapitre 1

La différence d'affinité de liaison entre l'agent de contraste et l'HSA (Albumine de Sérum Humain) avant, et après réaction enzymatique a également été exploitée pour augmenter la relaxivité des agents de contraste. C'est le cas de l'agent de contraste présenté par Caravan *et al.* en 2001. Cet agent de contraste est composé d'un chélate de Gd^{3+} de type DTPA, comportant un groupement diphénylalanine (ou 3,5-diiodotyrosine) possédant une bonne affinité de liaison avec la HSA, mais masqué par différents résidus lysine. En présence de l'enzyme TAFI (Inhibiteur de Fibrinolyse Activé par la Thrombine), les lysines en position C-terminale sont clivées libérant ainsi l'accès à la HSA pour former des liaisons non covalentes avec le groupement aryle de la molécule. Ainsi, la relaxivité de l'agent de contraste lié à l'HSA est 5 à 10 fois supérieure à celle du complexe avant la réaction enzymatique [95].

Dans le but d'optimiser au maximum la variation de relaxivité, des changements simultanés de q et de τ_r peuvent être exploités. C'est le cas du composé GdDO3A responsif à l'acide glutamique décarboxylase, de part les résidus glutamates présents sur sa structure chimique. Sous l'action de l'enzyme, il y a augmentation du nombre d'hydratation du complexe et formation de charges positives sur les résidus de la molécule, favorisant les liaisons entre l'agent de contraste et certaines macromolécules endogènes (q et τ_r augmentent) [96].

1.4.1.2 Agents de contraste paraCEST

En paraCEST, les forts déplacements chimiques paramagnétiques rendent la saturation du proton labile de l'agent paraCEST plus spécifique, et facilitent le suivi des changements catalysés par la réaction enzymatique, en réduisant les interférences provoquées par la saturation directe de l'eau ou par l'effet CEST des molécules endogènes. En plus des protons du complexe, de nombreux substrats enzymatiques possèdent des groupements chimiques comportant des protons labiles, tels que les groupements hydroxyle, amine ou amide, prodiguant de nombreuses possibilités de suivi de la réaction enzymatique par CEST.

Un exemple précurseur d'un agent de contraste paraCEST enzyme-responsif consiste en un complexe de Tm^{3+} comportant un ligand peptidique (DEVD-(TmDOTA)). La présence de ce peptide sur l'agent de contraste positionne un proton amide à proximité de l'ion Tm^{3+} générant un effet CEST unique à -51 ppm. Sous l'effet de la Caspase-3 sur l'agent de contraste, le peptide est coupé, et le lien amide entre le complexe et le peptide est changé en amine (**figure 1.16 (A)**).

De cette coupure résulte un changement de la fréquence de RM de l'effet CEST qui passe de -51ppm (pour l'amide) à +4ppm (pour l'amine), ainsi qu'une diminution de l'amplitude de cet effet expliqué par un changement de la vitesse d'échange de proton (**figure 1.16 (B)**) [97,98].

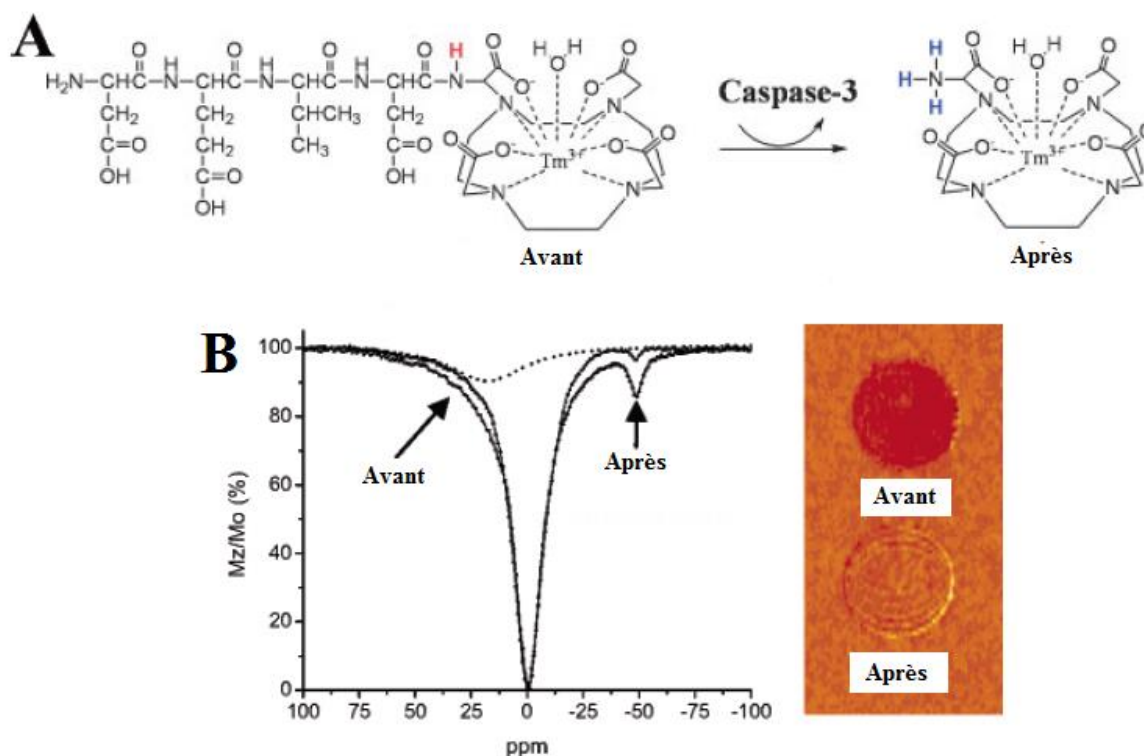


Figure 1.16 : Représentation des modifications moléculaires induites par la réaction enzymatique (A). Spectre et images CEST du composé DEVD-(TmDOTA) avant et après coupure enzymatique (B) [97,98]

Un autre exemple de conversion d'un amide en amine après la réaction enzymatique et celui du complexe de Yb^{3+} relié à l'ester substrat de l'estérase par un linker tri-méthyle lock (TML). Après la coupure de l'ester par l'enzyme, le résidu TML qui possède des interactions défavorables entre les trois groupements méthyles va être rapidement dissocié du complexe par une réaction de lactonisation donnant lieu à la formation d'une hydrocoumarine (**figure 1.17 (A)**).

Sur l'agent de contraste, l'amide est changé en amine qui peut produire un effet CEST à +12ppm. Sur cette molécule un deuxième proton amide est disponible et peut servir de contrôle puisqu'il ne va pas être modifié par la réaction enzymatique, mais il va être sensible à tous les autres paramètres qui influencent l'effet CEST (pH, température, etc.), il possède un effet CEST à -10ppm (**figure 1.17 (B)**) [99].

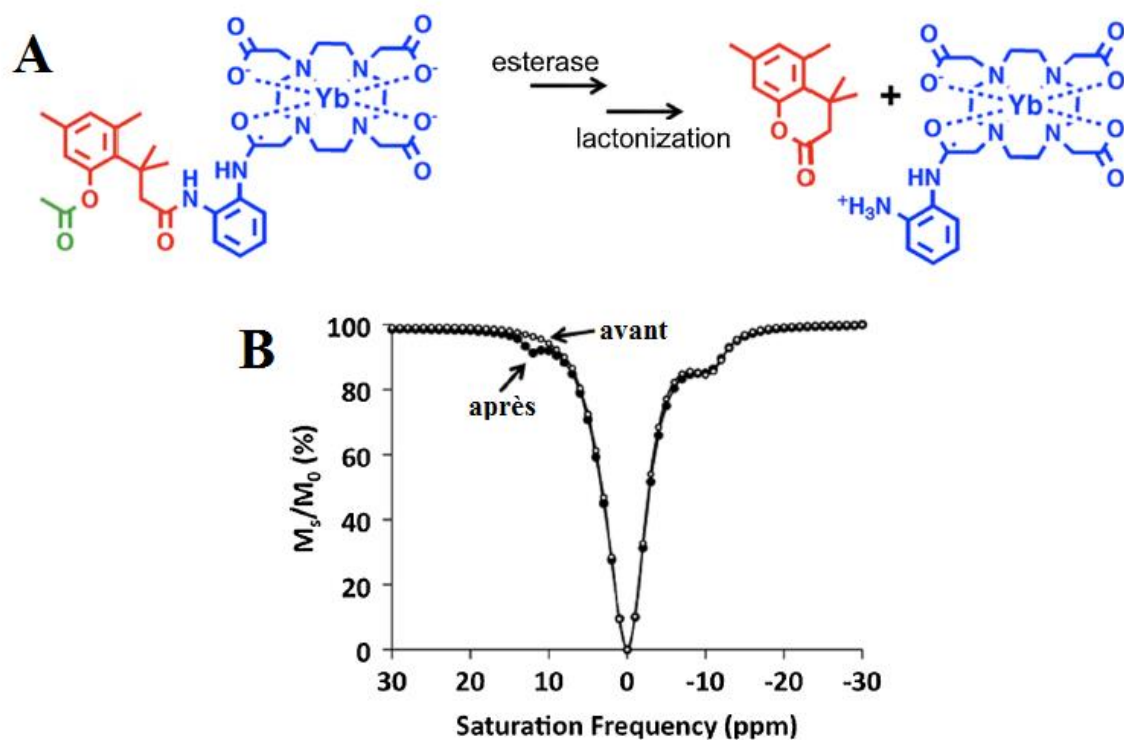


Figure 1.17: Représentation des modifications moléculaires induites par la réaction enzymatique et la lactonisation (A). Spectre CEST de l'agent de contraste avant et après coupure enzymatique (B) [99]

Le concept de linker auto-immolable a également été utilisé pour la conception d'agent de contraste paraCEST. Le premier exemple de détection de la β -galactosidase par paraCEST décrit un complexe d' Yb^{3+} lié au substrat galactopyranose par le biais d'un linker auto-immolable benzyloxycarbamate. La coupure enzymatique du substrat entraîne une cascade électronique, provoquant l'auto-élimination de l'espacer et la libération de l'amine, induisant l'apparition d'un effet CEST (**figure 1.18**) [100,101]. L'avantage de ce système est qu'il peut permettre la détection d'une large variété d'enzymes, par le simple fait de changer le substrat sur la structure chimique de l'agent de contraste.

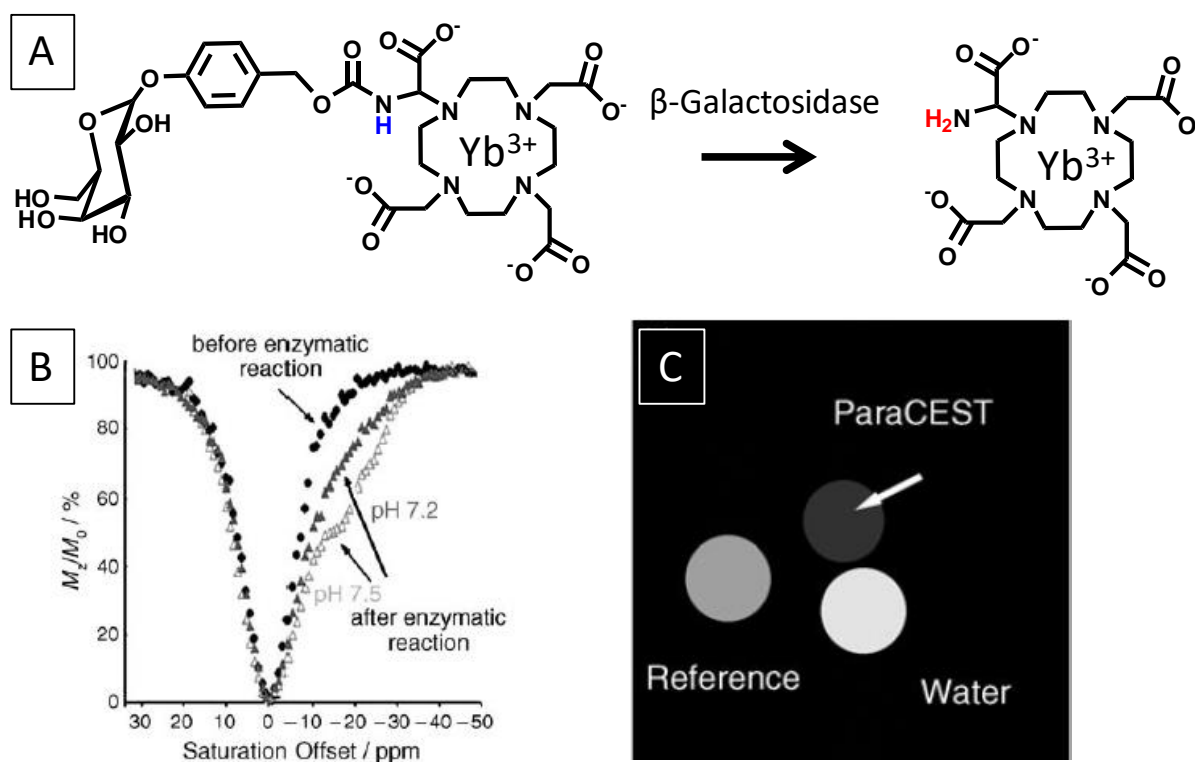


Figure 1.18: Représentation des modifications moléculaires induites par la réaction de l'enzyme sur le substrat et la cascade électronique du linker auto-immolable(A). Spectre CEST de l'agent de contraste avant et après coupure enzymatique (B). Image IRM de phantoms (400 MHz) (C) [100,101]

Ces trois exemples fonctionnent comme des sondes OFF/ON pour lesquelles le signal CEST apparaît après coupure enzymatique.

1.5 Objectifs de la Thèse

Imager le vivant au travers des processus biochimiques qui le caractérisent représente aujourd'hui encore un véritable challenge nécessitant la conception d'agents de contraste responsifs et spécifiques.

L'objectif majeur de ces travaux de thèse est le développement et la caractérisation de nouveaux agents de contraste à base de lanthanides possédant une réponse relaxométrique et/ou paraCEST pour la détection de l'activité enzymatique.

Si les paramètres régissant la relaxivité sont relativement facilement modifiables par le chimiste pour la conception rationnelle d'agents de contraste T_1 (complexes de Gd^{3+}), les paramètres structuraux des complexes de lanthanide qui régissent leur effet CEST sont bien moins identifiés.

Notre objectif était donc de mieux comprendre, via une variation systématique de la structure du ligand et de la nature du lanthanide, les relations entre structure moléculaire et effet CEST. Dans le contexte de détection enzymatique, nous avons étudié deux familles de ligands qui diffèrent par leur construction chimique. La première famille contient un espaceur auto-immolable (benzyloxy-carbamate) entre le substrat enzymatique et le complexe, alors que dans la deuxième famille, une fonction amide relie ces deux unités.

Le premier chapitre de résultats (Chapitre 2) rapporte l'étude de complexes macrocycliques de lanthanide comportant un bras auto-immolable, comme sonde « intelligente » pour la détection de l'activité enzymatique. L'intérêt de ces travaux est porté sur les conséquences de la modification de la position de l'espaceur auto-immolable dans la structure moléculaire sur les propriétés de relaxivité et de paraCEST des complexes. L'application de ces agents à la détection de l'activité de la β -galactosidase sera également présentée.

Le chapitre 3 présente l'étude de la stabilité thermodynamique et cinétique de complexes de lanthanide comportant un bras 2-méthylpyridine fonctionnalisé en position 6 par une fonction amine ou un groupement benzyloxycarbamate. L'influence du lanthanide sur les propriétés paraCEST des complexes macrocycliques ainsi que l'influence de la nature des protons labiles sur l'effet CEST sont discutés dans le Chapitre 4.

Le Chapitre 5 reporte la synthèse et la caractérisation des propriétés de relaxivité et paraCEST de sondes IRM comportant les substrats de la pénicilline amygdase, de la caspase 3 et de l'urokinase pour la détection spécifique de l'activité de ces enzymes.

Pour finir, l'étude de la stabilité thermodynamique de trois complexes de manganèse(II) formés à partir de ligands comportant un cœur pyridine est reportée dans une seconde partie. Les différentes voies de dissociation de ces complexes de manganèse sont également mises en évidence dans ce dernier chapitre.

1.6 Références

- (1) Geva, T.: Magnetic Resonance Imaging: Historical Perspective. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance* **2006**, *8*, 573-580.
- (2) Damadian, R.: Tumor Detection by Nuclear Magnetic Resonance. *Science* **1971**, *171*, 1151-1153.
- (3) Kauffman, G.: Nobel Prize for MRI Imaging Denied to Raymond V. Damadian a Decade Ago. *Chem. Educator* **2014**, *19*, 73-90.
- (4) Damadian, R.: Apparatus and Method for Detecting Cancer in Tissue. In *US Patent N°3789832*, , 1974.
- (5) Lauterbur, P. C.: Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance. *Nature* **1973**, *242*, 190-191.
- (6) Mansfield, P.; Grannell, P. K.: NMR 'diffraction' in solids? *Journal of Physics C: Solid State Physics* **1973**, *6*, L422.
- (7) Allen, P. S.; Andrew, E. R.; Bates, C. A.: *Magnetic resonance and related phenomena*; Amsterdam : North-Holland Pub. Co., 1974.
- (8) Doan, B.-T.; Mème, S.; Beloeil, J.-C.: General Principles of MRI. In *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*; John Wiley & Sons, Ltd, **2013**.
- (9) Hesselink, J. R.: Basic Principles of MR Imaging Medicine, U. S. D. S. o., Ed.; UC San Diego School of Medicine.
- (10) Kastler, B.; D.Vetter; Pattay, Z.; Germain, P.: *Comprendre l'IRM*; Elsevier Masson, **2011**.
- (11) James, M. L.; Gambhir, S. S.: A Molecular Imaging Primer: Modalities, Imaging Agents, and Applications. *Physiological Reviews* **2012**, *92*, 897-965.
- (12) Gupta, C. K.; Krishnamurthy, N.: *Extractive Metallurgy of Rare Earths*, 2004.
- (13) Cotton, F.; Wilkinson, G.: *Advanced Inorganic Chemistry*, 1988.
- (14) Atkins, P. W.: *Shriver & Atkins' inorganic chemistry*; Oxford University Press: Oxford; New York, 2010.
- (15) Peters, J. A.; Huskens, J.; Raber, D. J.: Lanthanide induced shifts and relaxation rate enhancements. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **1996**, *28*, 283-350.
- (16) G. N. La Mar, W. D. H., R. H. Holm: *NMR of Paramagnetic Molecules: Principles and Applications*, 1973.
- (17) Bertini, I.; Turano, P.; Vila, A. J.: Nuclear magnetic resonance of paramagnetic metalloproteins. *Chemical Reviews* **1993**, *93*, 2833-2932.
- (18) Johanna, V.; Tero, S.: Luminescent lanthanide reporters: new concepts for use in bioanalytical applications. *Methods and Applications in Fluorescence* **2014**, *2*, 012001.
- (19) Petoud, S.; Cohen, S. M.; Bünzli, J.-C. G.; Raymond, K. N.: Stable Lanthanide Luminescence Agents Highly Emissive in Aqueous Solution: Multidentate 2-Hydroxyisophthalamide Complexes of Sm³⁺, Eu³⁺, Tb³⁺, Dy³⁺. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 13324-13325.

Chapitre 1

- (20) Zhang, J.; Badger, P. D.; Geib, S. J.; Petoud, S.: Sensitization of Near-Infrared-Emitting Lanthanide Cations in Solution by Tropolonate Ligands. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 2508-2512.
- (21) Bünzli, J.-C. G.; Eliseeva, S. V.: Basics of Lanthanide Photophysics. In *Lanthanide Luminescence: Photophysical, Analytical and Biological Aspects*; Hänninen, P., Härmä, H., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2011; pp 1-45.
- (22) Selvin, P. R.: Principles and Biophysical Applications of Lanthanide-Based Probes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **2002**, *31*, 275-302.
- (23) Bünzli, J.-C. G.: Benefiting from the Unique Properties of Lanthanide Ions. *Accounts of Chemical Research* **2006**, *39*, 53-61.
- (24) Eliseeva, S. V.; Bünzli, J.-C. G.: Lanthanide luminescence for functional materials and bio-sciences. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39*, 189-227.
- (25) J. Charbonniere, L.: Luminescent Lanthanide Labels. *Current Inorganic Chemistry* **2011**, *1*, 2-16.
- (26) Lansman, J. B.: Blockade of current through single calcium channels by trivalent lanthanide cations. Effect of ionic radius on the rates of ion entry and exit. *The Journal of General Physiology* **1990**, *95*, 679-696.
- (27) Biagi, B. A.; Enyeart, J. J.: Gadolinium blocks low- and high-threshold calcium currents in pituitary cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **1990**, *259*, C515-C520.
- (28) Evans, C. H.: *Biochemistry of the Lanthanides*; Plenum Press, New York, 1990.
- (29) Vassallo, D. V.; Simoes, M. R.; Furieri, L. B.; Fioresi, M.; Fiorim, J.; Almeida, E. A. S.; Angeli, J. K.; Wiggers, G. A.; Peçanha, F. M.; Salaices, M.: Toxic effects of mercury, lead and gadolinium on vascular reactivity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **2011**, *44*, 939.
- (30) Tichy, M.; Rucki, M.: Lanthanides, Toxicity. In *Encyclopedia of Metalloproteins*; Kretsinger, R. H., Uversky, V. N., Permyakov, E. A., Eds.; Springer New York: New York, NY, 2013; pp 1149-1151.
- (31) Palasz, A.; Czekaj, P.: Toxicological and cytophysiological aspects of lanthanides action. *Acta Biochimica Polonica* **2000**, *47*, 1107-1114.
- (32) Hirano, S.; Suzuki, K. T.: Exposure, metabolism, and toxicity of rare earths and related compounds. *environmental Health Perspectives* **1996**, *104*, 85-95.
- (33) Idée, J.-M.; Port, M.; Raynal, I.; Schaefer, M.; Le Greneur, S.; Corot, C.: Clinical and biological consequences of transmetallation induced by contrast agents for magnetic resonance imaging: a review. *Fundamental & Clinical Pharmacology* **2006**, *20*, 563-576.
- (34) Tóth, É.; Király, R.; Platzeck, J.; Radüchel, B.; Brücher, E.: Equilibrium and kinetic studies on complexes of 10-[2,3-dihydroxy-(1-hydroxymethyl)-propyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetate. *Inorganica Chimica Acta* **1996**, *249*, 191-199.
- (35) Smith, R. M.; Martell, A. E.; Motekaitis, R. J.: NIST critically selected stability constants of metal complexes database. U.S. Dept. of Commerce, Technology Administration, National Institute of Standards and Technology, Standard Reference Data Program: Gaithersburg, MD, 1997.
- (36) Brücher, E.; Tircso, G.; Baranyai, Z.; Kovacs, Z.; Sherry, A. D.: Stability and Toxicity of Contrast Agents. In *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*; Jonh Wiley & Sons, Ltd, **2013**; pp 157.
- (37) Perazella, M. A.: Current Status of Gadolinium Toxicity in Patients with Kidney Disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **2009**, *4*, 461-469.
- (38) Hermann, P.; Kotek, J.; Kubicek, V.; Lukes, I.: Gadolinium(III) complexes as MRI contrast agents: ligand design and properties of the complexes. *Dalton Transactions* **2008**, 3027-3047.
- (39) Wedler, F. C.; Denman, R. B.: Glutamine Synthetase: The Major Mn(II) Enzyme in Mammalian Brain. In *Current Topics in Cellular Regulation*; Marlene DeLuca, H. L., Richard, L. C., Eds.; Academic Press, 1984; Vol. Volume 24; pp 153-154.
- (40) Aschner, M.; Erikson, K. M.; Dorman, D. C.: Manganese Dosimetry: Species Differences and Implications for Neurotoxicity. *Critical Reviews in Toxicology* **2005**, *35*, 1-32.

- (41) Rocklage, S. M.; Cacheris, W. P.; Quay, S. C.; Hahn, F. E.; Raymond, K. N.: Manganese(II) N,N'-dipyridoxylethylenediamine-N,N'-diacetate 5,5'-bis(phosphate). Synthesis and characterization of a paramagnetic chelate for magnetic resonance imaging enhancement. *Inorganic chemistry* **1989**, *28*, 477-485.
- (42) Pan, D.; Schmieder, A. H.; Wickline, S. A.; Lanza, G. M.: Manganese-based MRI contrast agents: past, present and future. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 8431-8444.
- (43) Pan, D.; Caruthers, S. D.; Senpan, A.; Schmieder, A. H.; Wickline, S. A.; Lanza, G. M.: Revisiting an old friend: manganese-based MRI contrast agents. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology* **2011**, *3*, 162-173.
- (44) Drahos, B.; Kubicek, V.; Bonnet, C. S.; Hermann, P.; Lukes, I.; Toth, E.: Dissociation kinetics of Mn²⁺ complexes of NOTA and DOTA. *Dalton Transactions* **2011**, *40*, 1945-1951.
- (45) Kueny-Stotz, M.; Garofalo, A.; Felder-Flesch, D.: Manganese-Enhanced MRI Contrast Agents: From Small Chelates to Nanosized Hybrids. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2012**, *2012*, 1987-2005.
- (46) Bloembergen, N.; Purcell, E. M.; Pound, R. V.: Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption. *Physical Review* **1948**, *73*, 679-712.
- (47) Solomon, I.: Relaxation Processes in a System of Two Spins. *Physical Review* **1955**, *99*, 559-565.
- (48) Solomon, I.; Bloembergen, N.: Nuclear Magnetic Interactions in the HF Molecule. *The Journal of Chemical Physics* **1956**, *25*, 261-266.
- (49) Bloembergen, N.: Proton Relaxation Times in Paramagnetic Solutions. *The Journal of Chemical Physics* **1957**, *27*, 572-573.
- (50) Bloembergen, N.; Morgan, L. O.: Proton Relaxation Times in Paramagnetic Solutions. Effects of Electron Spin Relaxation. *The Journal of Chemical Physics* **1961**, *34*, 842-850.
- (51) Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B.: Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. *Chemical Reviews* **1999**, *99*, 2293-2352.
- (52) Aime, S.; Botta, M.; Fasano, M.; Terreno, E.: Prototropic and Water-Exchange Processes in Aqueous Solutions of Gd(III) Chelates. *Accounts of Chemical Research* **1999**, *32*, 941-949.
- (53) Merbach, A. E.; E.Toth: *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*; John Wiley & Sons, Ltd, **2013**.
- (54) Caravan, P.: Protein-Targeted Gadolinium-Based Magnetic Resonance Imaging (MRI) Contrast Agents: Design and Mechanism of Action. *Accounts of Chemical Research* **2009**, *42*, 851-862.
- (55) Caravan, P.; Zhang, Z.: Targeted MRI Contrast Agents. In *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*; York, W. N., Ed., 2013; pp 311.
- (56) Tang, J.; Sheng, Y.; Hu, H.; Shen, Y.: Macromolecular MRI contrast agents: Structures, properties and applications. *Progress in Polymer Science* **2013**, *38*, 462-502.
- (57) Nicolay, K.; Strijkers, G.; Grüll, H.: Gd-Containing Nanoparticules as MRI Contrast Agents. In *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*; York, W. N., Ed., 2013; pp 449.
- (58) Longmire, M. R.; Ogawa, M.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H.: Dendrimers as high relaxivity MR contrast agents. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2014**, *6*, 155-162.
- (59) Qiao, Z.; Shi, X.: Dendrimer-based molecular imaging contrast agents. *Progress in Polymer Science* **2015**, *44*, 1-27.
- (60) Woods, M.; Woessner, D. E.; Sherry, A. D.: Paramagnetic lanthanide complexes as PARACEST agents for medical imaging. *Chemical Society Reviews* **2006**, *35*, 500-511.
- (61) Woessner, D. E.; Zhang, S.; Merritt, M. E.; Sherry, A. D.: Numerical solution of the Bloch equations provides insights into the optimum design of PARACEST agents for MRI. *Magnetic Resonance in Medicine* **2005**, *53*, 790-799.
- (62) Ward, K. M.; Aletras, A. H.; Balaban, R. S.: A New Class of Contrast Agents for MRI Based on Proton Chemical Exchange Dependent Saturation Transfer (CEST). *Journal of Magnetic Resonance* **2000**, *143*, 79-87.

Chapitre 1

- (63) Ward, K. M.; Balaban, R. S.: Determination of pH using water protons and chemical exchange dependent saturation transfer (CEST). *Magnetic Resonance in Medicine* **2000**, *44*, 799-802.
- (64) Aime, S.; Calabi, L.; Biondi, L.; De Miranda, M.; Ghelli, S.; Paleari, L.; Rebaudengo, C.; Terreno, E.: Iopamidol: Exploring the potential use of a well-established x-ray contrast agent for MRI. *Magnetic Resonance in Medicine* **2005**, *53*, 830-834.
- (65) van Zijl, P. C. M.; Jones, C. K.; Ren, J.; Malloy, C. R.; Sherry, A. D.: MRI detection of glycogen in vivo by using chemical exchange saturation transfer imaging (glycoCEST). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104*, 4359-4364.
- (66) Zhang, S.; Winter, P.; Wu, K.; Sherry, A. D.: A Novel Europium(III)-Based MRI Contrast Agent. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 1517-1518.
- (67) Aime, S.; Barge, A.; Delli Castelli, D.; Fedeli, F.; Mortillaro, A.; Nielsen, F. U.; Terreno, E.: Paramagnetic Lanthanide(III) complexes as pH-sensitive chemical exchange saturation transfer (CEST) contrast agents for MRI applications. *Magnetic Resonance in Medicine* **2002**, *47*, 639-648.
- (68) Zhang, S.; Merritt, M.; Woessner, D. E.; Lenkinski, R. E.; Sherry, A. D.: PARACEST Agents: Modulating MRI Contrast via Water Proton Exchange. *Accounts of Chemical Research* **2003**, *36*, 783-790.
- (69) Viswanathan, S.; Kovacs, Z.; Green, K. N.; Ratnakar, S. J.; Sherry, A. D.: Alternatives to Gadolinium-Based Metal Chelates for Magnetic Resonance Imaging. *Chemical Reviews* **2010**, *110*, 2960-3018.
- (70) Aime, S.; Carrera, C.; Delli Castelli, D.; Geninatti Crich, S.; Terreno, E.: Tunable Imaging of Cells Labeled with MRI-PARACEST Agents. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 1813-1815.
- (71) Ferrauto, G.; Castelli, D. D.; Terreno, E.; Aime, S.: In vivo MRI visualization of different cell populations labeled with PARACEST agents. *Magnetic Resonance in Medicine* **2013**, *69*, 1703-1711.
- (72) Ferrauto, G.; Delli Castelli, D.; Di Gregorio, E.; Langereis, S.; Burdinski, D.; Gröll, H.; Terreno, E.; Aime, S.: Lanthanide-Loaded Erythrocytes As Highly Sensitive Chemical Exchange Saturation Transfer MRI Contrast Agents. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136*, 638-641.
- (73) Nicholls, F. J.; Ling, W.; Ferrauto, G.; Aime, S.; Modo, M.: Simultaneous MR imaging for tissue engineering in a rat model of stroke. *Scientific Reports* **2015**, *5*, 14597.
- (74) Bonnet, C. S.; Tei, L.; Botta, M.; Toth, E.: Responsive Probes. In *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*; John Wiley & Sons, Ltd, **2013**; pp 343.
- (75) Bonnet, C.; Tóth, E.: Smart Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *Chimia* **2016**, *70*, 102-108.
- (76) Dhingra, K.; Fousková, P.; Angelovski, G.; Maier, M. E.; Logothetis, N. K.; Tóth, É.: Towards extracellular Ca²⁺ sensing by MRI: synthesis and calcium-dependent ¹H and ¹⁷O relaxation studies of two novel bismacrocylic Gd³⁺ complexes. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2008**, *13*, 35-46.
- (77) Mishra, A.; Fousková, P.; Angelovski, G.; Balogh, E.; Mishra, A. K.; Logothetis, N. K.; Tóth, É.: Facile Synthesis and Relaxation Properties of Novel Bispolyazamacrocyclic Gd³⁺ Complexes: An Attempt towards Calcium-Sensitive MRI Contrast Agents. *Inorganic chemistry* **2008**, *47*, 1370-1381.
- (78) Angelovski, G.; Fouskova, P.; Mamedov, I.; Canals, S.; Toth, E.; Logothetis, N. K.: Smart Magnetic Resonance Imaging Agents that Sense Extracellular Calcium Fluctuations. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1729-1734.
- (79) Li, W.-h.; Parigi, G.; Fragai, M.; Luchinat, C.; Meade, T. J.: Mechanistic Studies of a Calcium-Dependent MRI Contrast Agent. *Inorganic chemistry* **2002**, *41*, 4018-4024.
- (80) Que, E. L.; Chang, C. J.: A Smart Magnetic Resonance Contrast Agent for Selective Copper Sensing. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 15942-15943.
- (81) Jang, J. H.; Bhuniya, S.; Kang, J.; Yeom, A.; Hong, K. S.; Kim, J. S.: Cu²⁺-Responsive Bimodal (Optical/MRI) Contrast Agent for Cellular Imaging. *Organic Letters* **2013**, *15*, 4702-4705.

- (82) Major, J. L.; Boiteau, R. M.; Meade, T. J.: Mechanisms of ZnII-Activated Magnetic Resonance Imaging Agents. *Inorganic chemistry* **2008**, *47*, 10788-10795.
- (83) Major, J. L.; Parigi, G.; Luchinat, C.; Meade, T. J.: The synthesis and in vitro testing of a zinc-activated MRI contrast agent *pnas* **2007**, *104*, 13881-13886.
- (84) Bonnet, C. S.; Caille, F.; Pallier, A.; Morfin, J. F.; Petoud, S.; Suzenet, F.; Toth, E.: Mechanistic studies of gd(3+) -based MRI contrast agents for zn(2+) detection: towards rational design. *Chemistry* **2014**, *20*, 10959-69.
- (85) Giovenzana, G. B.; Negri, R.; Rolla, G. A.; Tei, L.: Gd-Aminoethyl-DO3A Complexes: A Novel Class of pH-Sensitive MRI Contrast Agents. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2012**, *2012*, 2035-2039.
- (86) Oukhatar, F.; Mème, S.; Mème, W.; Szeremeta, F.; Logothetis, N. K.; Angelovski, G.; Tóth, É.: MRI Sensing of Neurotransmitters with a Crown Ether Appended Gd3+ Complex. *ACS Chemical Neuroscience* **2015**, *6*, 219-225.
- (87) Moats, R. A.; Fraser, S. E.; Meade, T. J.: A "Smart" Magnetic Resonance Imaging Agent That Reports on Specific Enzymatic Activity. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1997**, *36*, 726-728.
- (88) Louie, A. Y.; Huber, M. M.; Ahrens, E. T.; Rothbacher, U.; Moats, R.; Jacobs, R. E.; Fraser, S. E.; Meade, T. J.: In vivo visualization of gene expression using magnetic resonance imaging. *Nat Biotech* **2000**, *18*, 321-325.
- (89) Urbanczyk-Pearson, L. M.; Femia, F. J.; Smith, J.; Parigi, G.; Duimstra, J. A.; Eckermann, A. L.; Luchinat, C.; Meade, T. J.: Mechanistic Investigation of β -Galactosidase-Activated MR Contrast Agents. *Inorganic chemistry* **2008**, *47*, 56-68.
- (90) Duimstra, J. A.; Femia, F. J.; Meade, T. J.: A Gadolinium Chelate for Detection of β -Glucuronidase: A Self-Immolative Approach. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 12847-12855.
- (91) Alexei, B.; Lars, M.; Christoph, B.; Alexander, P.; Ralph, W.: Oligomerization of Paramagnetic Substrates Result in Signal Amplification and can be Used for MR Imaging of Molecular Targets. *Molecular Imaging* **2002**, *1*, 16-23.
- (92) Hingorani, D. V.; Yoo, B.; Bernstein, A. S.; Pagel, M. D.: Detecting Enzyme Activities with Exogenous MRI Contrast Agents. *Chemistry – A European Journal* **2014**, *20*, 9840-9850.
- (93) Aime, S.; Cabella, C.; Colombatto, S.; Geninatti Crich, S.; Gianolio, E.; Maggioni, F.: Insights into the use of paramagnetic Gd(III) complexes in MR-molecular imaging investigations. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* **2002**, *16*, 394-406.
- (94) Lauffer, R. B.; McMurry, T. J.; Dunham, S. O.; Scott, D. M.; Parmelee, D. J.; Dumas, S.: Bioactivated diagnostic imaging contrast agents. Google Patents, 2004.
- (95) Nivorozhkin, A. L.; Kolodziej, A. F.; Caravan, P.; Greenfield, M. T.; Lauffer, R. B.; McMurry, T. J.: Enzyme-Activated Gd3+ Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents with a Prominent Receptor-Induced Magnetization Enhancement. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 2903-2906.
- (96) Napolitano, R.; Pariani, G.; Fedeli, F.; Baranyai, Z.; Aswendt, M.; Aime, S.; Gianolio, E.: Synthesis and Relaxometric Characterization of a MRI Gd-Based Probe Responsive to Glutamic Acid Decarboxylase Enzymatic Activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *56*, 2466-2477.
- (97) Yoo, B.; Pagel, M. D.: A PARACEST MRI contrast agent to detect enzyme activity. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 14032-14033.
- (98) Byunghee, Y.; Raam, M. S.; Rosenblum, R. M.; Pagel, M. D.: Enzyme-responsive PARACEST MRI contrast agents: a new biomedical imaging approach for studies of the proteasome. *Contrast media & molecular imaging* **2007**, *2*, 189-198.
- (99) Yuguo, L.; Sheth, V. R.; Guanshu, L.; Pagel, M. D.: A self-calibrating PARACEST MRI contrast agent that detects esterase enzyme activity. *Contrast media & molecular imaging* **2011**, *6*, 219-228.

Chapitre 1

(100) Chauvin, T.; Durand, P.; Bernier, M.; Meudal, H.; Doan, B.-T.; Noury, F.; Badet, B.; Beloeil, J.-C.; Tóth, É.: Detection of Enzymatic Activity by PARACEST MRI: A General Approach to Target a Large Variety of Enzymes. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 4370-4372.

(101) Chauvin, T.; Torres, S.; Rosseto, R.; Kotek, J.; Badet, B.; Durand, P.; Tóth, É.: Lanthanide(III) Complexes That Contain a Self-Immolative Arm: Potential Enzyme Responsive Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *Chemistry – A European Journal* **2012**, *18*, 1408-1418.

Chapitre 2

Complexes de Ln^{3+} comportant un espaceur auto-immolable : étude de l'influence de la position de l'espaceur sur les propriétés de relaxivité et de paraCEST, application à la détection de la β -galactosidase

Table des matières

2.1	Introduction.....	67
2.2.	Influence de la substitution de la pyridine sur les propriétés de relaxation des complexes.....	69
2.3.	Influence de la substitution de la pyridine sur les propriétés de paraCEST des complexes.....	73
2.4.	Caractérisation des effets CEST des complexes Yb(DO3A-Py-Cbz(5)) et Yb(DO3A-Py-NH₂(5)).....	76
2.4.1.	Mise en évidence de la présence d'isomères en solution.....	76
2.4.2.	Influence du pH.....	80
2.4.3.	Détermination des constantes de vitesse d'échange, k_{ex}	83
2.5.	Coupure enzymatique	93
2.5.1.	Suivi de la réaction enzymatique par paraCEST.....	94
2.5.2.	Suivi de la réaction enzymatique par relaxivité.....	97
2.6.	Conclusion.....	99
2.7.	Références.....	100

2.1. Introduction

De nos jours, le développement d'agents de contraste pour l'IRM est fortement orienté vers la conception de sondes activables pour la détection de paramètres physico-chimiques des tissus (pH, température, concentration en ion métallique, présence de métabolite, etc.) [1-5]. Ceci constitue un véritable challenge, puisque ces sondes doivent provoquer un changement de contraste sur les images RM spécifique au phénomène physiologique ciblé.

De nombreuses sondes, prometteuses pour la détection d'enzymes par IRM, ont été décrites ces 10 dernières années. Ces agents de contraste sont la plupart du temps des complexes de lanthanide, dont les propriétés paraCEST ou de relaxation sont modifiées par l'action d'une enzyme sur leur structure [2,3,5,6].

Une des approches proposées pour la conception de ces sondes, repose sur l'utilisation d'espaces auto-immolables. Certains de ces espaces utilisent l'instabilité intrinsèque des groupements benzyloxy-carbamates substitués par une fonction donneuse d'électrons, en position ortho ou para (**figure 2.1**). L'accrochage de cette fonction au substrat d'une enzyme par l'intermédiaire d'une liaison qui appauvrit sa densité électronique et qui peut être rompue enzymatiquement, permet de stabiliser l'espaceur et de le rendre sensible à l'action d'une enzyme. Etant donné la grande diversité de fonctions donneuses d'électrons, de liaisons et de substrats utilisables, cette approche permet la conception de plateformes moléculaires adaptables à la détection d'une large variété d'enzymes (**figure 2.1**).

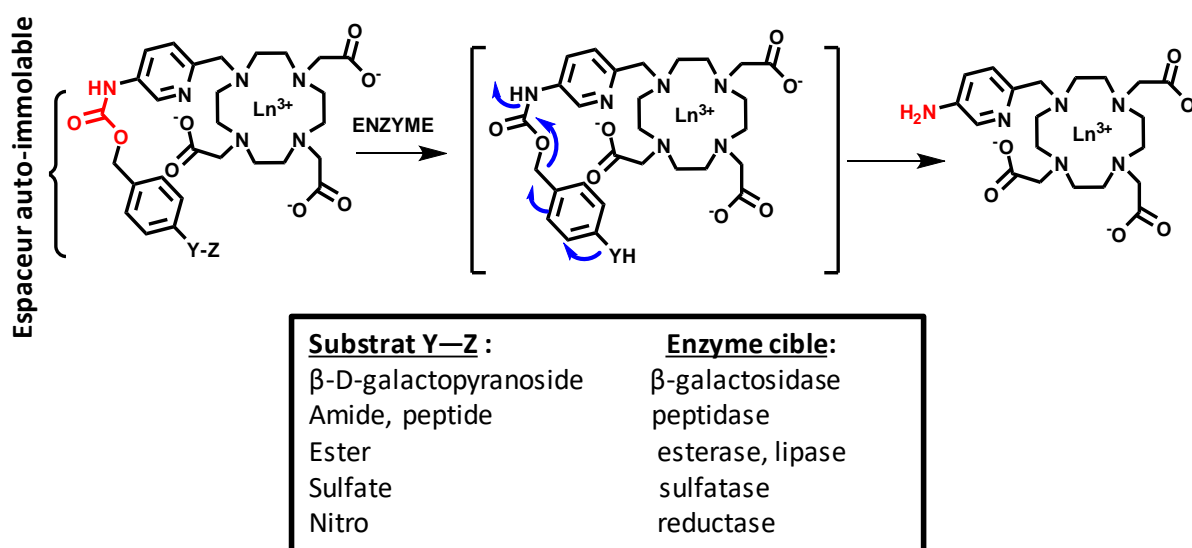


Figure 2.1 : Principe de la dégradation du bras auto-immolable induite par réaction d'une enzyme sur son substrat spécifique.

Chapitre 2

L'intérêt du mécanisme auto-immolable dans la conception de sondes IRM a déjà été démontré dans la littérature. Le premier exemple d'agent de contraste comportant un linker auto-immolable sensible à la β -galactosidase a été présenté par Meade *et. al.* Dans cet exemple, l'initiation de la cascade électronique par l'action de l'enzyme sur le substrat induit un changement du nombre d'hydratation du complexe de gadolinium se traduisant en une diminution de la relaxivité [7]. D'autres exemples pour la détection de l'activité enzymatique basée sur un changement de relaxivité après autodestruction du linker ont par la suite été décrits [8]. La modification des propriétés CEST induite par la destruction de l'espaceur auto-immolable a également été mise en évidence dans notre équipe. Dans ce cas l'élimination de l'espaceur conduit à la transformation d'un carbamate en une amine avec l'apparition d'un effet paraCEST [9].

Plus récemment, notre groupe a également reporté l'étude d'un composé modèle qui pourrait être adapté pour la détection multimodale paraCEST/T₁/luminescence d'une activité enzymatique [10]. La molécule modèle présentée (**figure 2.2, Yb(DO3A-Py-Cbz(6))**) est constituée d'une unité complexante pour les ions Ln³⁺ de type DO3A liée à une 6-amino-2-méthylpyridine ou à sa forme carbamate de benzyle. Ces deux formes présentent des propriétés optiques et magnétiques différentes selon que l'on utilise le Tb³⁺ (luminescence), l'Yb³⁺ (effet paraCEST) ou le Gd³⁺ (effet T₁) pour former le complexe. Ainsi en remplaçant le carbamate de benzyle par un espaceur auto-immolable, il devrait être possible d'obtenir une sonde multimodale pour la détection d'une activité enzymatique.

Forts de ces résultats, nous avons voulu nous intéresser à l'influence de la position sur la pyridine de la fonction amine et sa forme carbamate, sur les propriétés de relaxivité et paraCEST de différents complexes de lanthanides. Nous nous sommes intéressés dans un premier temps aux complexes des ligands modèles : **DO3A-Py-Cbz(3-5)** et **DO3A-Py-NH₂(3-5)**, représentant respectivement les états de l'agent de contraste avant et après la coupure enzymatique. La différence de structure entre les membres de ces deux familles de ligands **DO3A-Py-Cbz(3-5)** et **DO3A-Py-NH₂(3-5)** provient de la position de l'amine sur la pyridine (positions 3,4,5 ou 6) (**figure 2.2**). Pour les plus intéressants d'entre eux, leur capacité à fournir des agents de contraste activables a été étudiée en introduisant un espaceur auto-immolable sensible à la β -galactosidase à la place du carbamate de benzyle. Des essais de coupure enzymatique des complexes de lanthanide correspondant ont été suivis par mesures paraCEST et T₁. Tous les composés ont été synthétisés et caractérisés par l'équipe du Dr Philippe Durand, au laboratoire ICSN à Gif sur Yvette.

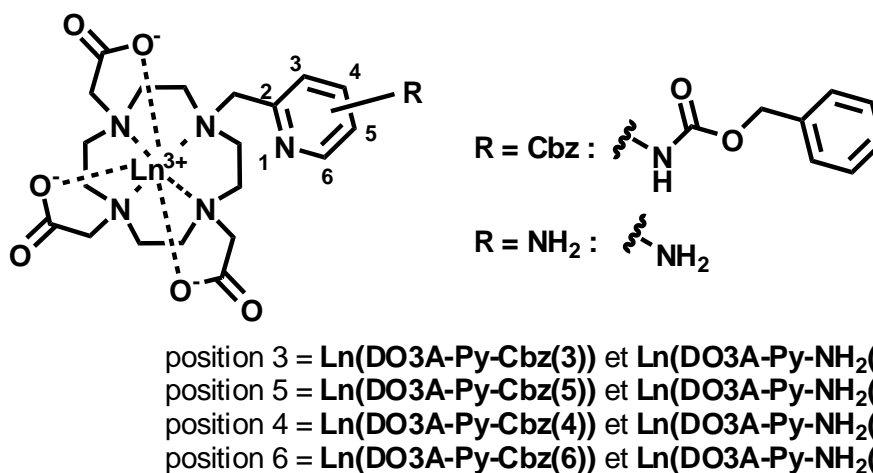


Figure 2.2 : Structure des complexes discutés dans le texte. $\text{Ln}^{3+} = \text{Gd}^{3+}, \text{Yb}^{3+}, \text{Eu}^{3+}$

2.2. Influence de la substitution de la pyridine sur les propriétés de relaxation des complexes

La Dispersion de la Relaxation Magnétique Nucléaire du proton (^1H NMRD) est une technique utile pour déterminer les paramètres microscopiques influençant la relaxivité des complexes de Gd^{3+} [11]. Lors de cette analyse, la relaxivité r_1 du complexe de Gd^{3+} est mesurée en fonction de la fréquence de Larmor du proton. Le profil des courbes NMRD obtenues est déterminé par différents paramètres tels que le nombre de molécules d'eau coordonnées à l'ion métallique et la vitesse d'échange de celles-ci avec les molécules d'eau du solvant, le temps de corrélation rotationnelle du complexe ainsi que les paramètres de relaxation électronique.

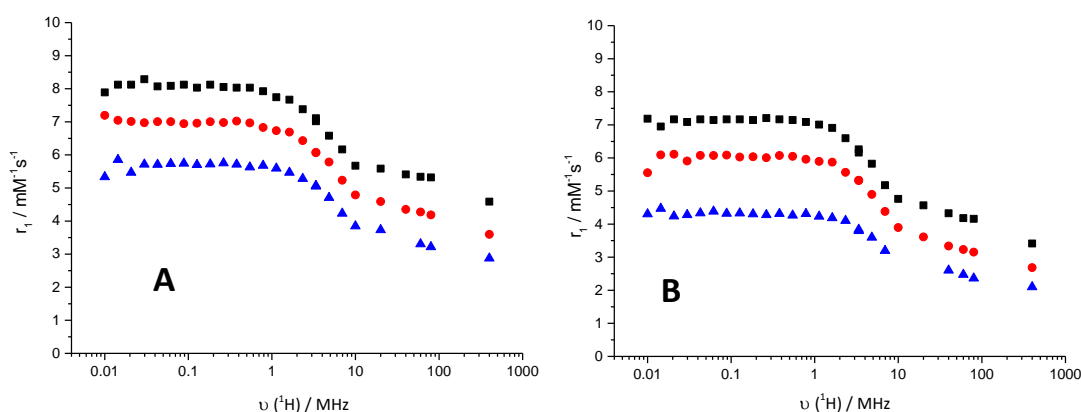


Figure 2.3 : Relaxivité du proton, r_1 , en fonction de la fréquence de Larmor à différentes températures, 25°C (■), 37°C (●) et 50°C (▲) pour $\text{Gd}(\text{DO3A-Py-Cbz}(5))$ (A) et $\text{Gd}(\text{DO3A-Py-NH}_2(5))$ (B).

Chapitre 2

Les propriétés de relaxivité des complexes **Gd(DO3A-Py-Cbz(6))** et **Gd(DO3A-Py-NH₂(6))** ont déjà été reportés [10], elles ne seront donc pas détaillées ici.

Les profils des mesures de NMRD de **Gd(DO3A-Py-Cbz(5))** et **Gd(DO3A-Py-NH₂(5))** réalisées à 25°C, 37°C et 50°C à des champs magnétiques compris entre 0.01 et 400MHz (**figure 2.3**), montrent une dépendance de la relaxivité r_1 avec la température. La relaxivité diminue lorsque la température augmente quelle que soit la fréquence de Larmor appliquée (**figure 2.3**). L'allure générale des profils et leur dépendance de température suivent la tendance communément observée pour des complexes de Gd³⁺ à faible poids moléculaire, pour lesquels la rotation est le facteur limitant de la relaxivité.

Tableau 2.1 : Valeurs de relaxivité des complexes de Gd³⁺ mesurées à pH 7.4, 37°C et 20MHz

	r_1 (mM \cdot s ⁻¹)
Gd(DO3A-Py-Cbz(5))	4.59
Gd(DO3A-Py-NH₂(5))	3.61
Gd(DO3A-Py-Cbz(4))	3.80
Gd(DO3A-Py-NH₂(4))	2.85
Gd(DO3A-Py-Cbz(3))	3.45
Gd(DO3A-Py-NH₂(3))	2.58

La comparaison des valeurs de relaxivité entre les complexes modélisant l'état avant coupure enzymatique (**Gd(DO3A-Py-Cbz(3-5))**) et après coupure enzymatique (**Gd(DO3A-Py-NH₂(3-5))**) montre une diminution de la relaxivité de l'ordre de 20% quelle que soit la position étudiée. Ce faible changement de relaxivité ne semble pas lié à un changement du nombre d'hydratation q du complexe, mais plutôt à un changement du temps de corrélation rotationnelle τ_r , qui est plus important pour (**Gd(DO3A-Py-Cbz(3-5))**) (puisque de poids moléculaire plus élevé) que pour (**DO3A-Py-NH₂(3-5)**).

Afin de vérifier cette hypothèse, le nombre de molécules d'eau coordonnées au métal (q) a été déterminé en mesurant le temps de décroissance de luminescence des complexes d'Eu³⁺ des ligands **DO3A-Py-Cbz(5)** et **DO3A-Py-NH₂(5)** dans des solutions H₂O et D₂O. Nous avons ici utilisé l'effet d'antenne de la pyridine pour exciter l'Eu à la longueur d'onde $\lambda_{\text{ex}}=290$ nm.

Les temps de vie de luminescence mesurés sont : $\tau_{\text{H}_2\text{O}}=0.640$ ms et $\tau_{\text{D}_2\text{O}}=2.100$ ms pour le complexe **Eu(DO3A-Py-Cbz(5))** et $\tau_{\text{H}_2\text{O}}=0.497$ ms et $\tau_{\text{D}_2\text{O}}=1.374$ ms pour le complexe **Eu(DO3A-Py-NH₂(5))**. A partir de ces données, les valeurs de q ont été calculées par les méthodes de Horrocks [12,13] $q=0.9\pm 0.2$ (**Eu(DO3A-Py-Cbz(5))**) ; $q=1.1\pm 0.2$ (**Eu(DO3A-Py-NH₂(5))**), et de Parker [14] $q=1.0\pm 0.2$ (**Eu(DO3A-Py-Cbz(5))**) ; $q=1.2\pm 0.2$ (**Eu(DO3A-Py-NH₂(5))**). Les valeurs de q ainsi obtenues indiquent la présence d'une molécule d'eau dans la première sphère de coordination pour les deux complexes. Ces résultats démontrent que contrairement à ce qui a été observé avec le complexe de gadolinium de la précédente série (**Gd(DO3A-Py-Cbz(6))**) (**figure 2.4 A**), le carbamate n'est pas coordonné au métal pour les complexes **Ln(DO3A-Py-Cbz(3-5))**. La structure cristallographique obtenue à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (Gif-sur-Yvette) du complexe **Yb(DO3A-Py-Cbz(5))** (**figure 2.4 B**), démontre l'absence de coordination du carbamate au lanthanide. Aucune molécule d'eau n'est cependant coordonnée sur le complexe d'Yb³⁺ ce qui n'est pas étonnant puisque l'Yb³⁺ possède un petit diamètre atomique et la complexation avec des ligands octaédrique lui est favorable, en revanche, les résultats de relaxivité sont en accord avec la présence d'une molécule d'eau dans la première sphère de coordination du métal pour le complexe de Gd³⁺.

Les variations de relaxivité observées sont donc très certainement dues à des variations de τ_r , en accord avec le changement de taille du complexe.

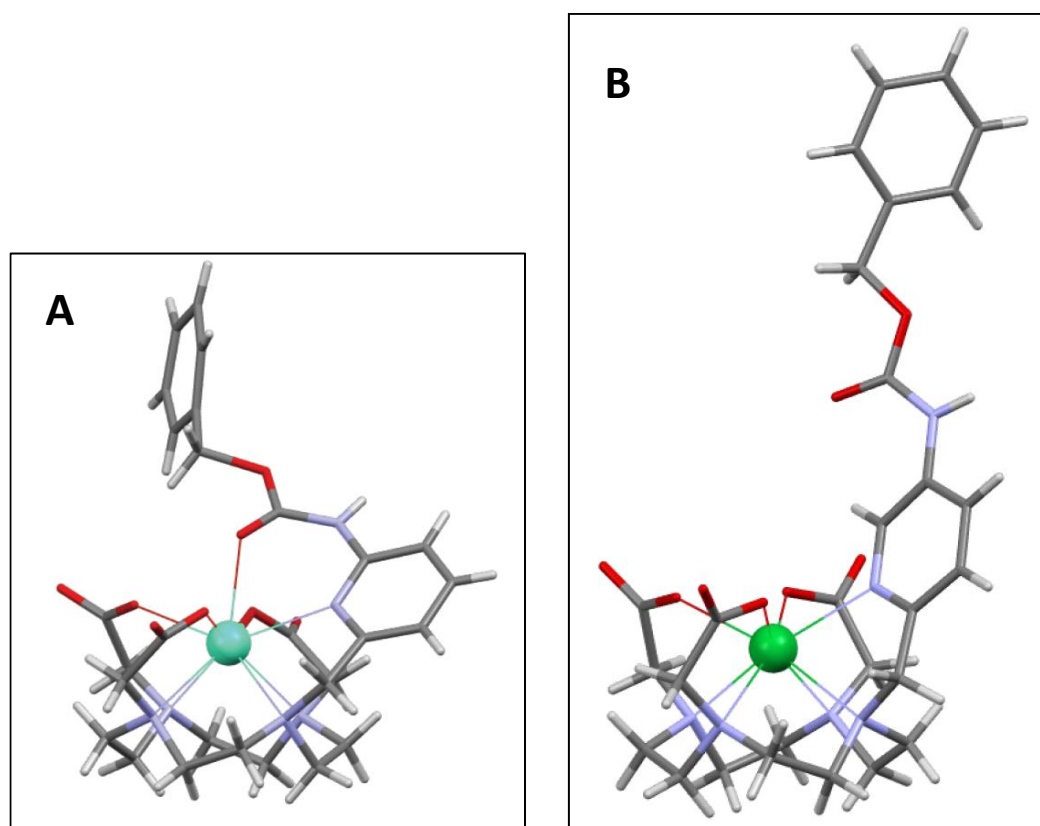


Figure 2.4 : Structures cristallographique des complexes **Gd(DO3A-Py-Cbz(6))** (A) et **Yb(DO3A-Py-Cbz(5))** (B)

Les variations de relaxivité mesurées pour les complexes **Gd(DO3A-Py-Cbz(3-5))** et **GdLNH2(3-5)** sont différentes de celles observées pour les complexes **Gd(DO3A-Py-Cbz(6))** et **Gd((DO3A-Py-NH₂(6))**, pour lesquels la relaxivité passait respectivement de $1.74 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à $3.32 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ soit une augmentation de r_1 de 52%. Cette augmentation de relaxivité s'explique par un changement du nombre de molécules d'eau coordonnées au complexe comme cela était également démontré par des mesures de luminescence sur les analogues d' Eu^{3+} et de Tb^{3+} [10].

Ainsi, le positionnement du carbamate sur les carbones autres que celui situé en position 6 de la pyridine (**Ln(DO3A-Py-Cbz(3-5))**) aboutit à son éloignement du métal et défavorise fortement sa coordination sur le centre métallique. A l'inverse, lorsque le carbamate se trouve en position 6 de la pyridine (**Ln(DO3A-Py-Cbz(6))**), sa coordination au centre métallique est favorisée par sa proximité avec l'azote hétérocyclique coordonnant de la pyridine.

Etant donné la faible variation de relaxivité observée entre les dérivés carbamate et amine qui représentent les modèles avant et après coupure enzymatique pour les positions 3, 4 et 5, nous n'avons pas poursuivi une étude plus poussée des propriétés de relaxivité de ces composés.

2.3. Influence de la substitution de la pyridine sur les propriétés de paraCEST des complexes

L'efficacité du transfert de saturation après irradiation d'un ensemble de protons labiles dont la fréquence de résonance ν^{on} est différente de celle de l'eau (effet CEST) peut être exprimée de la manière suivante :

$$\%CEST = \left(1 - \frac{M_S}{M_0}\right) \times 100 \quad (2.1)$$

M_S correspond à l'intensité du signal des protons du solvant (H₂O) lorsque la saturation est appliquée à la radiofréquence de résonance (RF) du proton labile ν^{on} , et M_0 est l'intensité de référence du signal qui est enregistré après l'application de l'impulsion RF à une fréquence $\nu^{\text{off}} = -\nu^{\text{on}}$.

Des mesures de l'effet CEST ont été effectuées pour chacun des composés **Ln(DO3A-Py-Cbz(3-5))** et **Ln(DO3A-Py-NH₂(3-5))**. Les complexes d'Eu³⁺ et d'Yb³⁺ ont été étudiés. En effet, dans la plupart des cas, ces deux lanthanides sont les plus intéressants pour leur effet CEST.

Ces expériences ont été effectuées à 25°C, pour différentes valeurs de pH, l'acquisition a été réalisée sur une fenêtre de 300ppm (de -150 à 150ppm) avec une saturation appliquée tous les 0.5 ppm.

Dans le cas des complexes **Ln(DO3A-Py-Cbz(3-5))**, l'effet CEST est attendu *via* le proton porté par l'azote du carbamate, qui est l'unique proton échangeable de la molécule. Dans le cas des complexes **Ln(DO3A-Py-NH₂(3-5))**, ce sont les protons de l'amine qui sont susceptibles de générer un effet CEST.

Les composés **Ln(DO3A-Py-Cbz(4-3))** et **Ln(DO3A-Py-NH₂(4-3))** ne montrent aucun effet CEST, quelque soit le pH et le lanthanide (Eu³⁺, Yb³⁺) étudié (**figure 2.5**).

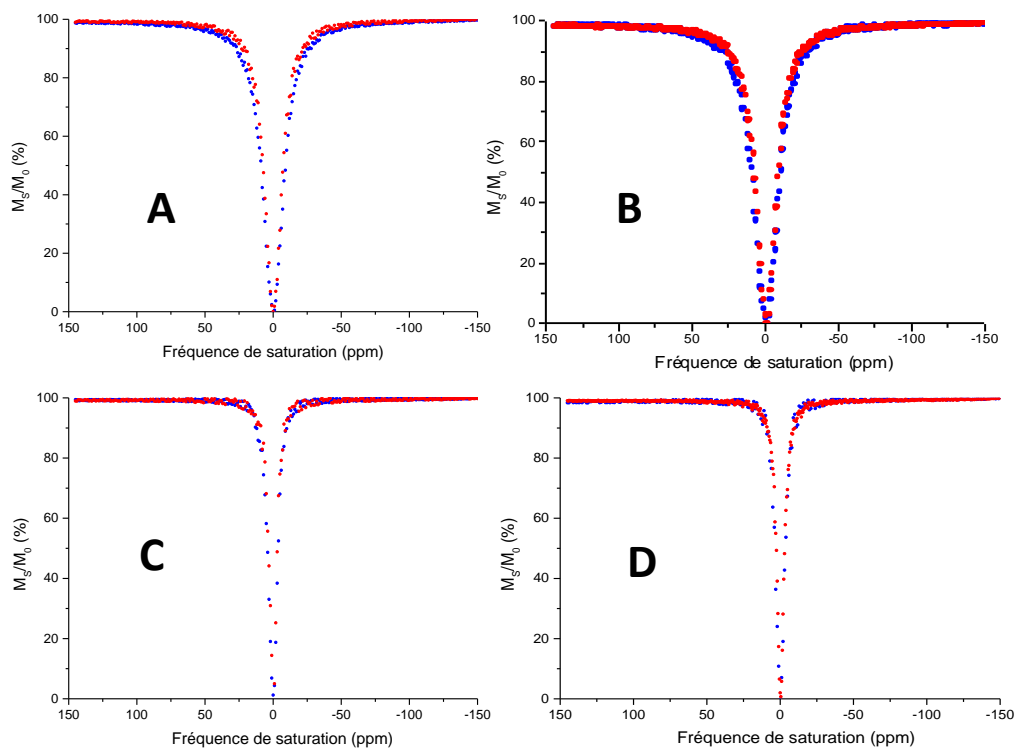


Figure 2.5 : Spectres CEST des complexes **Eu(DO3A-Py-R(4))** (A), **Eu(DO3A-Py-Cbz-R(3))** (B), **Yb(DO3A-Py-R(4))** (C) et **Yb(DO3A-Py-R(3))** (D), pour **R=Cbz** (●) et **R=NH₂** (●), 295K, 20mM, pH7.0

En ce qui concerne les complexes des ligands **DO3A-Py-Cbz(5)** et **DO3A-Py-NH₂(5)**, seuls ceux formés avec l'ion **Yb³⁺** présentent plusieurs effets CEST (**figure 2.6**).

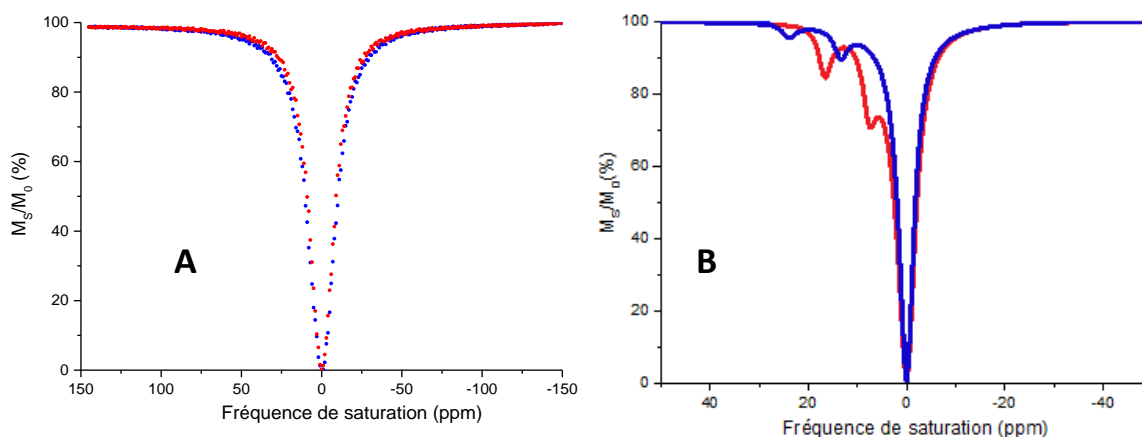



Figure 2.6 : Spectres CEST des complexes **Eu(DO3A-Py-R(5))** (A) et **Yb(DO3A-Py-R(5))** (B), pour **R=Cbz** (●) et **R=NH₂** (●), 295K, 20mM, pH7.0

Complexes de Ln³⁺ comportant un espaceur auto-immolable

Ces résultats sont à comparer avec ceux obtenus pour les composés **Eu(DO3A-Py-Cbz(6))** et **Yb(DO3A-Py-Cbz(6))** pour lesquels des effets CEST étaient observés à 11 et 40ppm, respectivement, mais pas pour leurs analogues amines [10].

Tableau 2.2 : Récapitulatif des effets CEST observés en fonction des ligands et des lanthanides utilisés (pH 7.4 et 298K)

Eloignement du carbamate de l'azote de la pyridine
Δω diminue



	Ln(DO3A-Py-Cbz(6))	Ln(DO3A-Py-Cbz(5))	Ln(DO3A-Py-Cbz(4))	Ln(DO3A-Py-Cbz(3))
Eu	Effet CEST 11ppm	-	-	-
Yb	Effet CEST 40ppm	Effet CEST 13 et 24ppm	-	-

Ces résultats (récapitulées dans le **tableau 2.2**) montrent que, plus le carbamate est éloigné de l'azote hétérocyclique (et donc du centre métallique), moins d'effet CEST est observé. Ces informations laissent supposer que la distance du proton labile au centre paramagnétique et la coordination du carbamate sont sans doute des facteurs déterminant de l'effet CEST. Malgré l'absence de coordination du carbamate pour **Ln(DO3A-Py-Cbz(5))**, la distance du proton labile au centre métallique est certainement plus faible que dans le cas des complexes **Ln(DO3A-Py-Cbz(3-4))**.

De plus, Δω diminue lorsque le carbamate est éloigné de l'azote de la pyridine. Nous pouvons supposer que l'éloignement du proton labile du centre paramagnétique induit une diminution du déplacement chimique (Δω) de celui-ci et qu'il ne satisfait donc pas la condition d'échange lent $\Delta\omega \geq k_{ex}$ qui est nécessaire pour observer l'effet de transfert de saturation. D'après les propriétés LIS des lanthanides, les déplacements chimiques de RMN des complexes d'Eu³⁺ sont inférieurs à ceux des complexes d'Yb³⁺ [15], ceci peut expliquer le fait que l'effet CEST ne soit pas observé pour **Eu(DO3A-Py-Cbz(5))**.

2.4. Caractérisation des effets CEST des complexes $\text{Yb}(\text{DO3A-Py-Cbz}(5))$ et $\text{Yb}(\text{DO3A-Py-NH}_2(5))$

2.4.1. Mise en évidence de la présence d'isomères en solution

Les complexes $\text{Yb}(\text{DO3A-Py-Cbz}(5))$ et $\text{Yb}(\text{DO3A-Py-NH}_2(5))$ présentent chacun deux effets CEST : à 13 et 24 ppm pour $\text{Yb}(\text{DO3A-Py-Cbz}(5))$ et 16 et 7 ppm pour $\text{Yb}(\text{DO3A-Py-NH}_2(5))$, (le plus grand des pics correspond au signal de l'eau centré à 0 ppm) (**figure 2.6 (B)**). Dans le cas de $\text{Yb}(\text{DO3A-Py-Cbz}(5))$, deux effets CEST sont également présents alors qu'il n'y a qu'un seul proton échangeable (le NH du carbamate). Une observation similaire a été reportée pour le complexe $\text{Yb}(\text{HPDO3A})$ (HPDO3A= acide 10-2(hydroxypropyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododécane-1,4,7-triacétique), pour lequel les deux effets CEST provenant de la fonction -OH du composé ont été attribués à chacun des deux isomères du complexe en solution [1].

Nous nous sommes intéressés à l'étude des spectres RMN des deux complexes $\text{Yb}(\text{DO3A-Py-Cbz}(5))$ et $\text{Yb}(\text{DO3A-Py-NH}_2(5))$, afin de comprendre la provenance de ces différents effets CEST. Dans le cas d'une symétrie C_1 , 34 signaux RMN sont attendus pour $\text{Yb}(\text{DO3A-Py-Cbz}(5))$ et 27 pour $\text{Yb}(\text{DO3A-Py-NH}_2(5))$, cependant, plus de 50 signaux sont dénombrés dans chacun des cas, démontrant la présence de différents isomères en solution (**figure 2.7**).

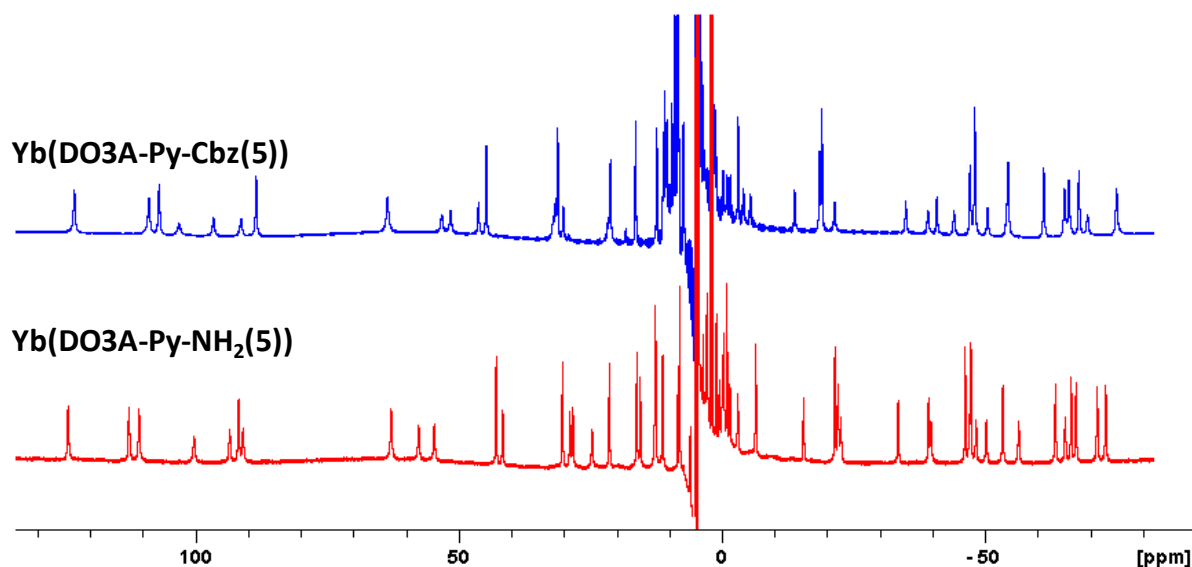


Figure 2.7 : Spectres RMN ^1H des complexes $\text{Yb}(\text{DO3A-Py-Cbz}(5))$ et $\text{Yb}(\text{DO3A-Py-NH}_2(5))$, 295K, 20mM, pH 6.5 ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 5%)

Complexes de Ln³⁺ comportant un espaceur auto-immolable

La présence de ces différents isomères peut provenir des différentes conformations que peuvent avoir les complexes en solution. En effet, les complexes métalliques formés à partir d'un macrocycle tel que les dérivés du DOTAM ou du DOTA peuvent adopter deux conformations différentes : la conformation carré anti prismatique notée SAP et carré anti prismatique distordu notée TSAP [4]. Ces formes sont déterminées par l'orientation relative entre les plans formés par les atomes d'azote et d'oxygène du chélate. Deux sources de chiralité définissent les isomères SAP et TSAP, la première provient de la conformation des ponts éthylène formés entre deux azotes du macrocycle ($\delta\delta\delta\delta$ ou $\lambda\lambda\lambda\lambda$) et la deuxième provient de l'hélicité des bras carboxylate (Δ , orientés dans le sens des aiguilles d'une montre ou Λ , orientés dans le sens contraire) [4]. L'interconversion des isomères SAP/TSAP peut avoir lieu par inversion de la conformation du cycle ou par rotation des bras carboxylate (**figure 2.8.**). La complexation d'un ion lanthanide par un ligand conduit à une modification importante des déplacements chimiques de ces protons qui est fonction de leur distance et de leur position à l'ion Ln(III) paramagnétique. Cette modification de déplacement est en effet directement liée à l'interaction dipolaire et à l'interaction de contact entre le spin nucléaire et le spin électronique. Ces isomères conformationnels sont généralement caractérisés par cristallographie par rayons X et par RMN ¹H.

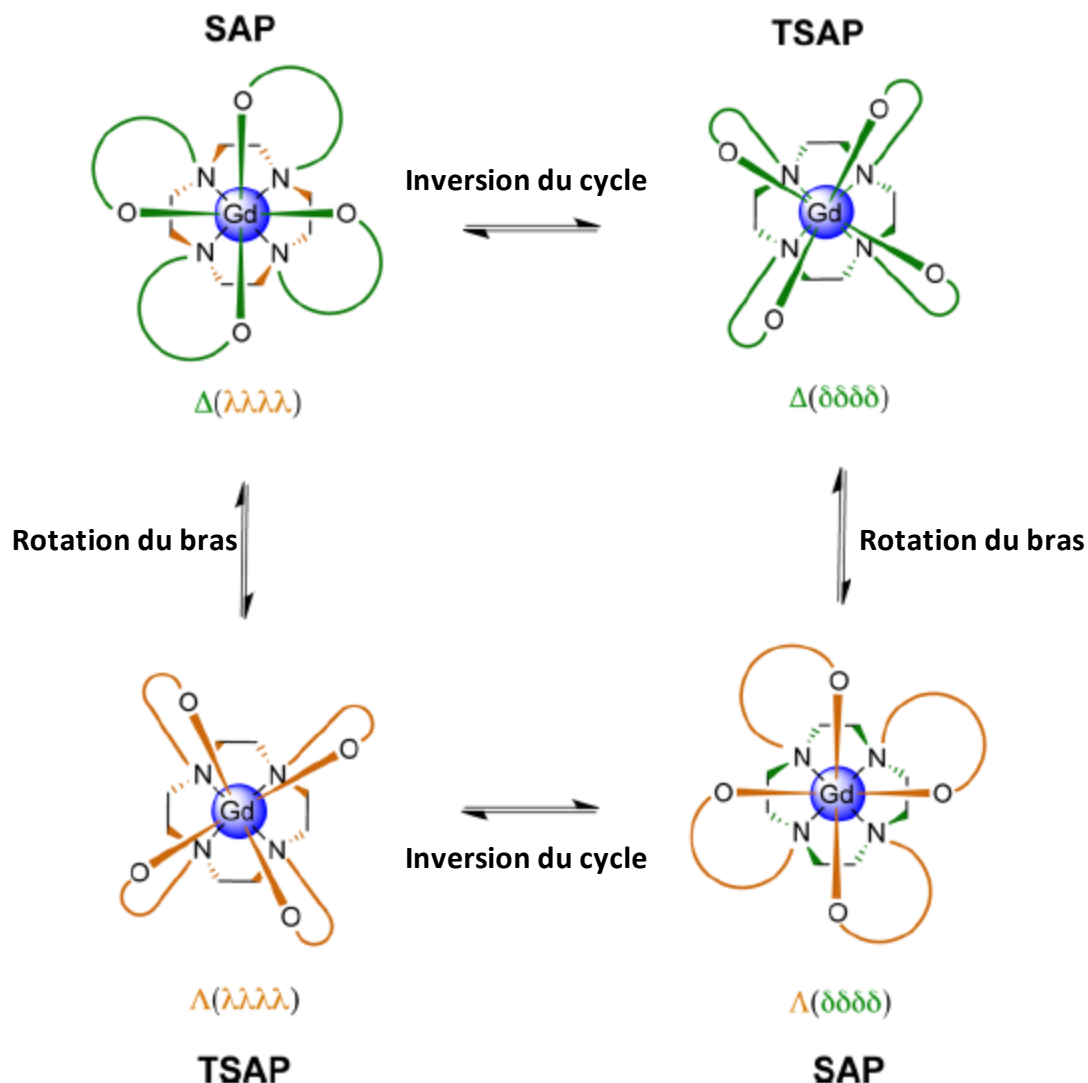


Figure 2.8 : Représentation schématique de l'interconversion des isomères SAP/TSAP [4,16]

Ainsi, le signal paraCEST du proton labile du NH peut être détecté pour chacun des deux isomères SAP et TSAP présents en solution, donnant lieu à deux effets CEST. La détection de plusieurs effets CEST liés à la formation des isomères SAP et TSAP a déjà été reportée pour des protons échangeables provenant de fonctions amide [17,18] ou alcool [1]. Les deux effets CEST observés pour **Yb(DO3A-Py-Cbz(5))** peuvent s'expliquer par la présence en solutions des isomères SAP et TSAP. En revanche, le composé **Yb(DO3A-Py-Cbz(6))** ne présente qu'un seul isomère en solution montrant que la complexation du carbamate sur le lanthanide contraint la conformation du complexe en solution (en cours de publication).

Complexes de Ln³⁺ comportant un espaceur auto-immolable

Concernant le complexe **Yb(DO3A-Py-NH₂(5))**, la présence de deux effets CEST peut s'expliquer de différentes manières. Ils peuvent être liés à la présence en solution des deux isomères SAP/TSAP, mais ils peuvent provenir également des deux hydrogènes de l'amine primaire, dans le cas où ceux-ci ne sont pas magnétiquement équivalents. Un tel phénomène a déjà été observé pour un complexe d'Yb³⁺ dans le cas d'un ligand dérivé du DOTA dont l'un des bras acétates est substitué en position α par une amine [19] ou encore pour les protons amide du composé Yb(DOTAM) (DOTAM= 1,4,7,10-tetraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétamide) [20]. Des études RMN 2D ont été menées pour tenter de répondre à cette question. Le spectre COSY ne montre pas de couplage entre les signaux des deux protons donnant un effet CEST, indiquant qu'ils n'appartiennent pas à la même molécule (**figure 2.9**). Ainsi on peut conclure que les deux effets CEST observés pour le complexe **Yb(DO3A-Py-NH₂(5))** proviennent des isomères SAP et TSAP, présents en solution.

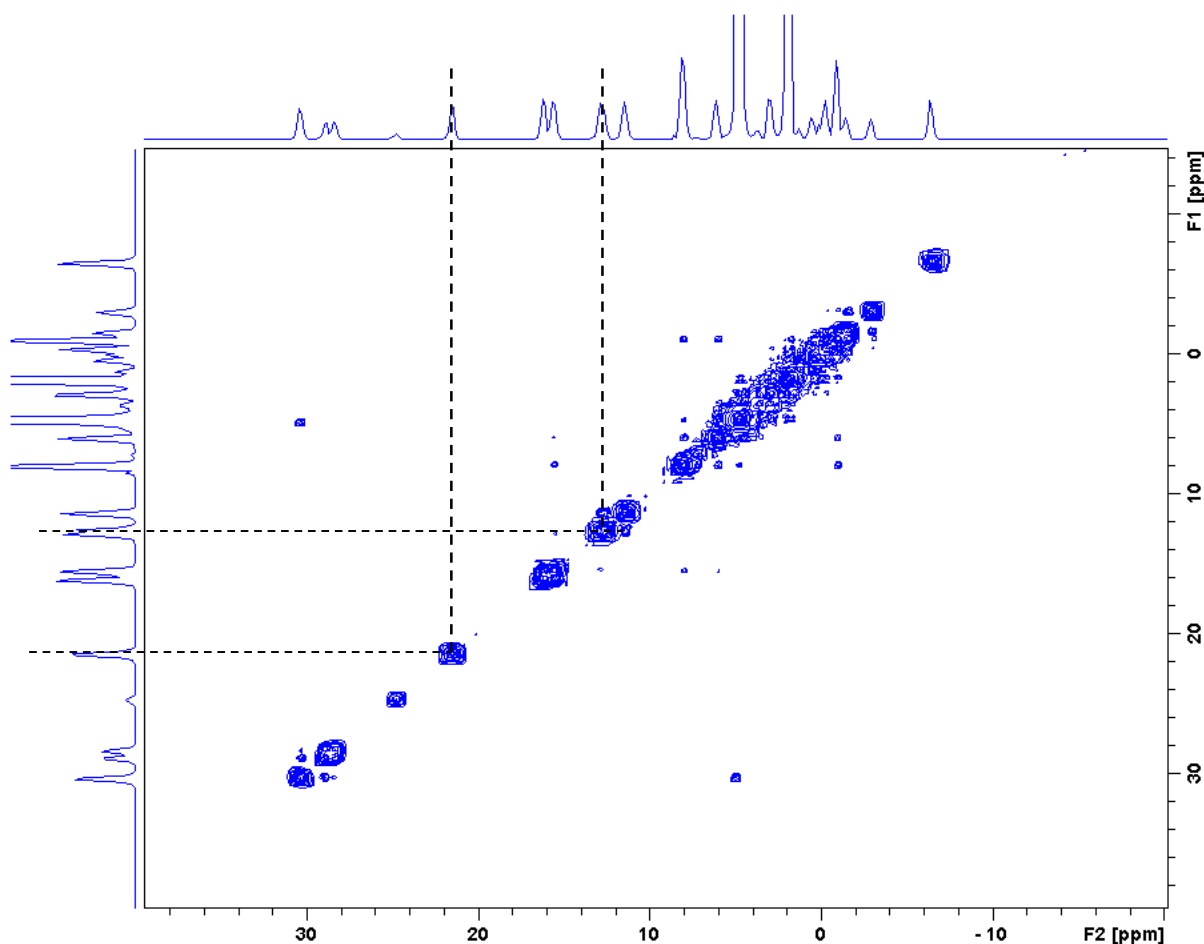


Figure 2.9 : Spectre COSY ¹H du complexe **Yb(DO3A-Py-NH₂(5))** (H₂O/D₂O 5%), zoom sur la région d'intérêt. Les signaux des hydrogènes labiles sont signalés en pointillés.

Chapitre 2

La mesure des proportions en isomères SAP/TSAP le long de la série des lanthanides montre dans le cas des complexes du DOTA une prédominance de la conformation SAP pour les complexes formés avec les lanthanides les plus lourds, comme l'Yb par exemple [21]. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que les isomères majoritaires des complexes **Yb(DO3A-Py-Cbz(5))** et **Yb(DO3A-Py-NH₂(5))** sont en conformation SAP tandis que les isomères minoritaires sont en conformation TSAP. Il est à noter également que des études de cristallographie (non publiées), démontrent que le complexe **Yb(DO3A-Py-Cbz(6))** est uniquement présent en conformation SAP.

De plus, ces mêmes études cristallographiques montrent que la distance entre le proton carbamate et le lanthanide est plus faible dans le cas d'une conformation SAP ($d_{H-Ln} \cong 4.49 \text{ \AA}$) que dans le cas d'une conformation TSAP ($d_{H-Ln} \cong 4.62 \text{ \AA}$), ainsi, l'effet CEST est plus déplacé par rapport au pic de l'eau pour un complexe en conformation SAP qu'en conformation TSAP (résultats en cours de publication). Nous pouvons alors supposer que les signaux CEST observés à champs plus faible pour **Yb(DO3A-Py-Cbz(5))** (pic à 24 ppm) et **Yb(DO3A-Py-NH₂(5))** (pic à 16 ppm) correspondent aux isomères SAP alors que les signaux CEST observés à champs plus fort pour **Yb(DO3A-Py-Cbz(5))** (pic à 13 ppm) et pour **Yb(DO3A-Py-NH₂(5))** (pic à 7 ppm) sont dus aux isomères TSAP.

2.4.2. Influence du pH

L'influence du pH sur l'effet CEST des isomères SAP et TSAP a été étudiée pour les complexes **Yb(DO3A-Py-Cbz(5))** et **Yb(DO3A-Py-NH₂(5))** (figure 2.10 A et B).

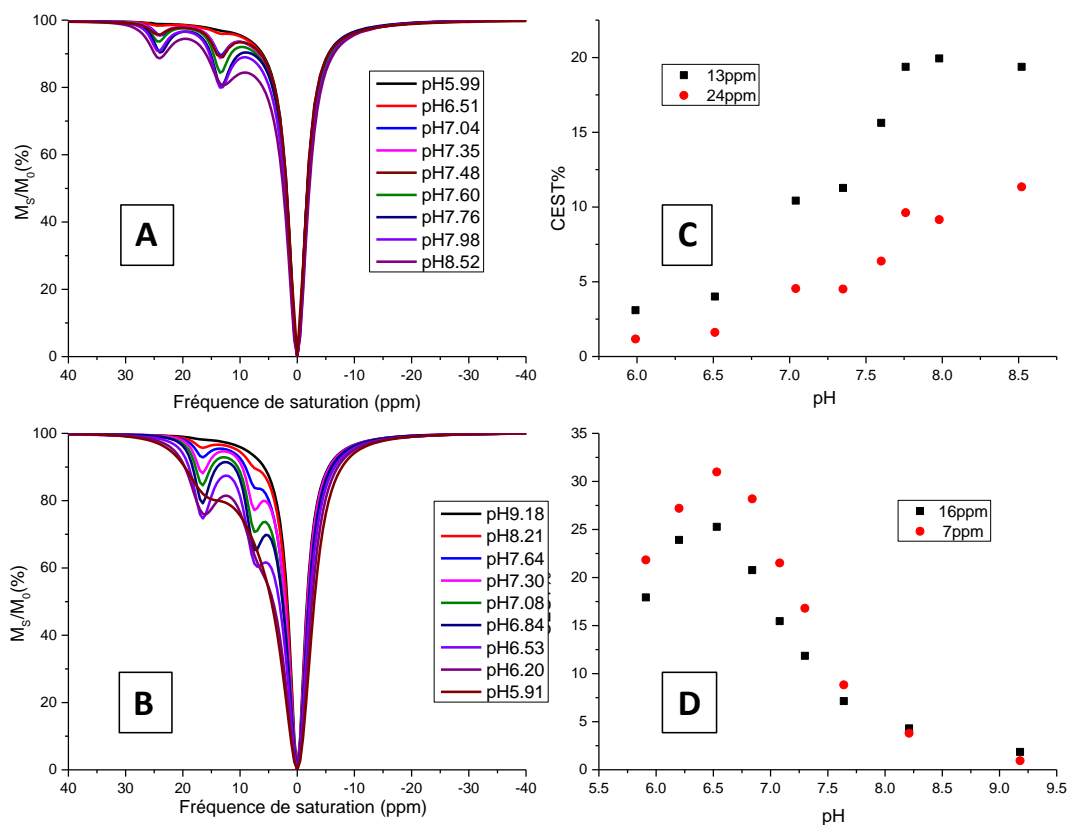


Figure 2.10 : Spectres CEST des complexes $\text{Yb}(\text{DO3A-Py-Cbz}(\mathbf{5}))$ (A) et $\text{Yb}(\text{DO3A-Py-NH}_2(\mathbf{5}))$ (B), 295K, 20mM obtenus à différents pH, et évolution de l'intensité de l'effet CEST en fonction du pH pour $\text{Yb}(\text{DO3A-Py-Cbz}(\mathbf{5}))$ à 13ppm et 24ppm (C) et pour $\text{Yb}(\text{DO3A-Py-NH}_2(\mathbf{5}))$ à 7ppm et 16ppm (D).

L'effet CEST observé pour chacun des deux complexes ($\text{Yb}(\text{DO3A-Py-Cbz}(\mathbf{5}))$ et $\text{Yb}(\text{DO3A-Py-NH}_2(\mathbf{5}))$) dépend fortement du pH. Son intensité augmente avec le pH dans le cas de $\text{Yb}(\text{DO3A-Py-Cbz}(\mathbf{5}))$ alors qu'elle diminue dans le cas de $\text{Yb}(\text{DO3A-Py-NH}_2(\mathbf{5}))$. Ces observations peuvent être confirmées par l'analyse des spectres RMN ¹H des deux complexes réalisés à différents pH :

Les spectres RMN ¹H du complexe $\text{Yb}(\text{DO3A-Py-Cbz}(\mathbf{5}))$ montrent de larges pics correspondant aux protons échangeables ($\delta = 18\text{ppm}$ et $\delta = 29\text{ppm}$) (figure 2.11 (A)). Ces signaux s'élargissent lorsque le pH augmente jusqu'à disparaître au-delà de pH 6.5, indiquant une augmentation de la vitesse d'échange des protons lorsque le pH augmente. L'élargissement des pics pourrait être aussi la conséquence d'un échange de plus en plus rapide entre les deux isomères, néanmoins, dans ce cas-là, les autres signaux auraient le même comportement.

Chapitre 2

Ce phénomène est moins facile à observer pour le complexe **Yb(DO3A-Py-NH₂(5))** pour lequel on distingue également les signaux de l'amine primaire ($\delta = 12\text{ppm}$ et $\delta = 21\text{ppm}$) (**figure 2.10 (B)**).

Contrairement au cas précédent, ces pics s'élargissent lorsque le pH diminue, indiquant alors la diminution de la vitesse d'échange des protons lorsque le pH augmente.

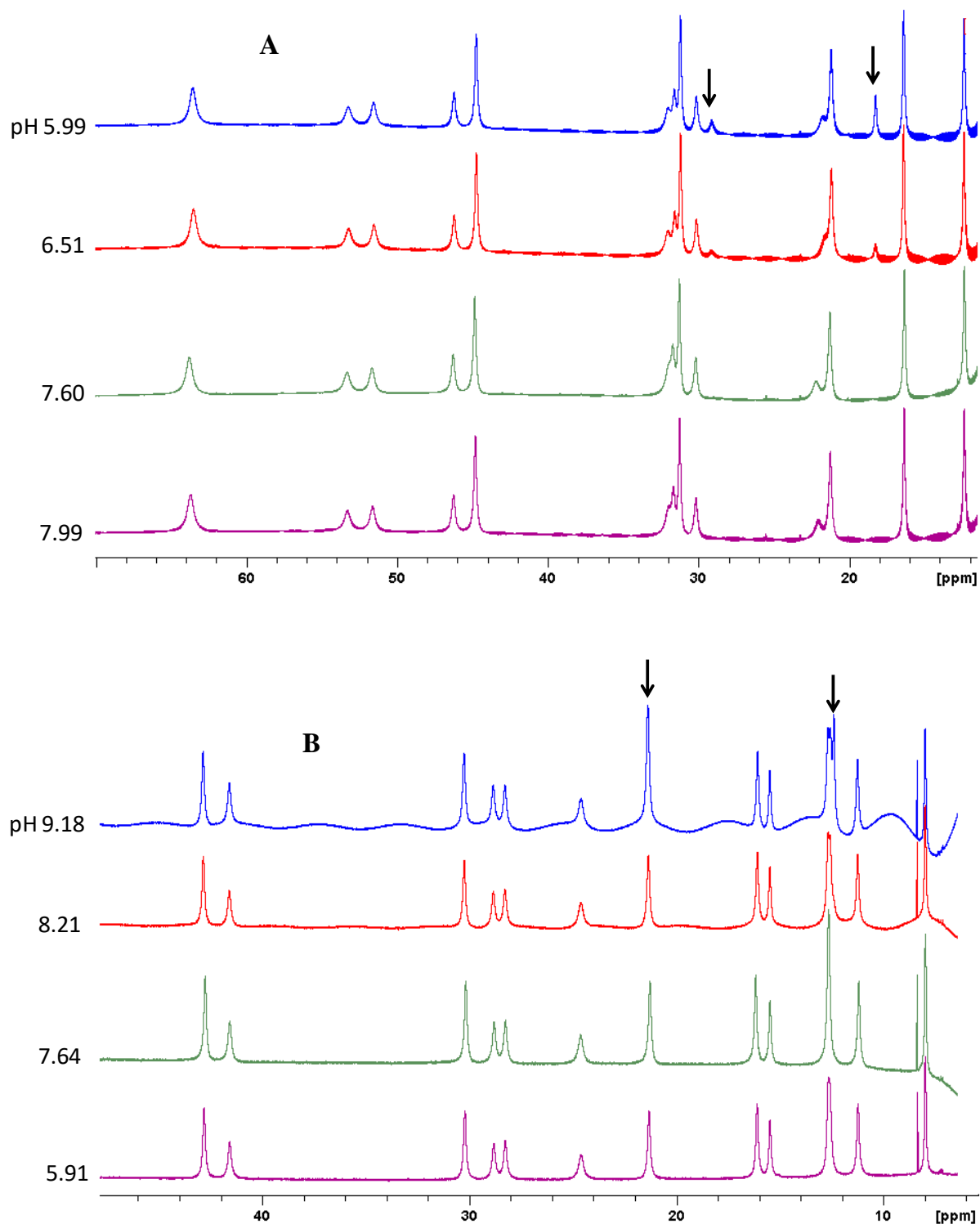


Figure 2.11 : Spectres RMN ¹H obtenus à 400MHz et à différents pH pour les composés **Yb(DO3A-Py-Cbz(5))** (A) et **Yb(DO3A-Py-NH₂(5))** (B), 295K, 20mM.

2.4.3. Détermination des constantes de vitesse d'échange, k_{ex}

Afin de comprendre l'évolution de l'effet CEST pour chacun des deux complexes modèles **Yb(DO3A-Py-Cbz(5))** et **Yb(DO3A-Py-NH₂(5))**, nous avons déterminé la vitesse d'échange des protons échangeables.

De nombreuses méthodes sont couramment utilisées pour déterminer les vitesses d'échange des protons, comme la quantification de la vitesse d'échange par modulation du temps de saturation (QUEST) ou par modulation de la puissance de saturation (QUESP) [22].

Dans l'hypothèse où l'état d'équilibre est atteint après saturation des protons échangeables de l'agent, l'effet CEST peut être décrit comme une fonction de la puissance ω_l et du temps de saturation t_{sat} (**équation 2.2**) où x_{CA} correspond au rapport entre la concentration en proton labile de l'agent et la concentration en proton labile du solvant et R_{1W} est la vitesse de relaxation longitudinale des protons de l'eau à l'état de saturation.

$$1 - \frac{M_S}{M_0} = \frac{k_{ex} a x_{CA}}{R_{1W} + k_{ex} x_{CA}} \times [1 - e^{-(R_{1W} + k_{ex} x_{CA}) t_{sat}}] \quad (2.2)$$

L'efficacité de la saturation dépend de la puissance de saturation ω_l (**équation 2.3**) avec $R_{1,2S}$ et $R_{1,2W}$ qui sont les taux de relaxation longitudinale et transversale du soluté (S) et du solvant (eau notée W).

$$a = \frac{\omega_1^2}{\omega_1^2 + pq} \quad (2.3)$$

$$p = R_{2S} + k_{ex} - \frac{k_{ex}^2 x_{CA}}{R_{2W} + k_{ex} x_{CA}} \quad (2.4)$$

$$q = R_{1S} + k_{ex} - \frac{k_{ex}^2 x_{CA}}{R_{1W} + k_{ex} x_{CA}} \quad (2.5)$$

Chapitre 2

L'équation (2.6) est utilisée pour déterminer les constantes de vitesse d'échange par variation du temps de saturation (QUEST) et l'équation (2.7) pour déterminer les constantes de vitesse d'échange par variation de la puissance de saturation (QUESP).

$$1 - \frac{M_S}{M_0} = 1 - \left(\frac{1}{1 + k_{ex}x_{CA}T_1} + \frac{k_{ex}x_{CA}T_1}{1 + k_{ex}x_{CA}T_1} e^{-\left(\frac{1+k_{ex}x_{CA}T_1}{T_1}\right)t_{sat}} \right) \quad (2.6)$$

$$\frac{M_S}{M_0 - M_S} = \frac{55.5}{c} k_{ex} R_{1W} \left(\frac{1}{k_{ex}^2} + \frac{1}{\omega_1^2} \right) \quad (2.7)$$

Chacune de ces deux méthodes nécessite de connaître la concentration en agent de contraste. Dans notre cas, plusieurs isomères sont présents en solution et la proportion de chacun des isomères ne peut pas être déterminée simplement. Afin de déterminer les vitesses d'échange des protons, nous nous sommes intéressés à des méthodes qui ne dépendent pas de la concentration du complexe.

La première méthode indépendante de la concentration utilisée provient d'une modification de l'analyse des expériences QUESP, il s'agit de la méthode « oméga-plot » [23]. Le tracé de $M_S/(M_0-M_S)$ en fonction de $1/\omega_1^2$ donne une droite linéaire dont l'intersection avec l'axe des abscisses permet d'obtenir un accès direct à la vitesse d'échange $1/k_{ex}^2$ (équation 2.8).

$$-\frac{1}{k_{ex}^2} = \frac{1}{\omega_1^2} \quad (2.8)$$

Plus récemment, la méthode Hannes-Woolf QUESP (HW-QUESP), dérivée de la méthode « oméga-plot » et également indépendante de la concentration, a été décrite pour déterminer les constantes de vitesse d'échange des protons [24] (équation 2.9).

$$\frac{\omega_1^2 M_S}{M_0 - M_S} = \frac{\omega_1^2 R_1}{x_{CA} k_{ex}} + \frac{R_1 k_{ex}}{x_{CA}} \quad (2.9)$$

Complexes de Ln³⁺ comportant un espaceur auto-immolable

Le tracé de $(\omega_l^2 M_S)/(M_0 - M_S)$ en fonction de ω_l^2 donne une droite dont l'intersection avec l'axe des abscisses donne un accès direct au carré de la vitesse d'échange k_{ex}^2 (équation 2.10).

$$-k_{ex}^2 = \omega_1^2 \quad (2.10)$$

Pour des raisons de fiabilité des valeurs calculées et de comparaisons, nous avons utilisé les deux méthodes oméga-plot et HW-QUEST pour déterminer les constantes de vitesses d'échange des protons. Pour chacun des deux complexes **Yb(DO3A-Py-Cbz(5))** et **Yb(DO3A-Py-NH₂(5))**, les constantes de vitesse d'échange ont été déterminées à différentes valeurs de pH et pour les deux isomères présents en solution. Pour cela, des expériences QUEST ont été réalisées à 20mM, 25°C avec des puissances de saturations comprises entre 13 et 51μT (5 et 20mW).

2.4.3.1. k_{ex} du complexe **Yb(DO3A-Py-Cbz(5))**

La **figure 2.12** représente les tracés linéaires des méthodes analytiques oméga-plot et HW-QUEST, les droites obtenues avec les points expérimentaux ont été ajustées pour obtenir les valeurs de k_{ex} qui sont détaillées dans le **tableau 2.3**. Les deux méthodes utilisées pour déterminer les k_{ex} ont donné des valeurs très similaires. Le k_{ex} moyen est calculé en faisant la moyenne des valeurs obtenues par les deux méthodes (**tableau 2.3**).

De la même manière que ce que nous avons observé pour l'intensité des effets CEST, les k_{ex} des deux isomères (à 13 et à 24ppm) sont significativement affectés par le pH. Les vitesses d'échange sont constantes pour des pH compris entre 7.04 et 7.60 puis augmentent lorsque le pH augmente. De plus, il est intéressant de noter que les valeurs de k_{ex} des deux isomères appartiennent à la même gamme de valeur.

A notre connaissance, très peu de constantes de vitesses provenant d'un effet CEST d'un proton carbamate sont reportées dans la littérature. Les valeurs de k_{ex} obtenues sont comparables à celle des composés **Tb(DO3A-Py-Cbz(6))** ($k_{ex} = 4300 \pm 300 \text{s}^{-1}$ et $5000 \pm 400 \text{s}^{-1}$ pour les deux isomères, pH 7.4, 298K [10]) et **Yb(DO3A-Py-Cbz(6))** ($k_{ex} = 6100 \pm 100 \text{s}^{-1}$, pH 7.4, 310K [10] et $k_{ex} = 1400 \pm 100 \text{s}^{-1}$, pH 7.4, 298K, non publié).

Chapitre 2

Il est intéressant de noter que dans les mêmes conditions expérimentales, la valeur de k_{ex} obtenue pour **Yb(DO3A-Py-Cbz(6))** est sensiblement inférieure à celle de **Yb(DO3A-Py-Cbz(5))** (d'un facteur $\cong 2$), cette différence peut être expliquée par l'éloignement du proton labile par rapport au lanthanide qui est plus important pour **Yb(DO3A-Py-Cbz(5))** que pour **Yb(DO3A-Py-Cbz(6))**.

Ces valeurs sont également du même ordre de grandeur (10^3 s^{-1}) que les k_{ex} obtenus pour les protons amides du composé Yb-DOTAM (DOTAM=1,4,7,10-tetrakis(carbamoylméthyl)-1,4,7,10-tetrazacyclododecane) ($k_{ex} = 1562 \text{ s}^{-1}$ et 1923 s^{-1} , pH 7.4, 298K) reportés par Sherry et al. (pour lequel les effets CEST proviennent de protons amide non équivalents) [20].

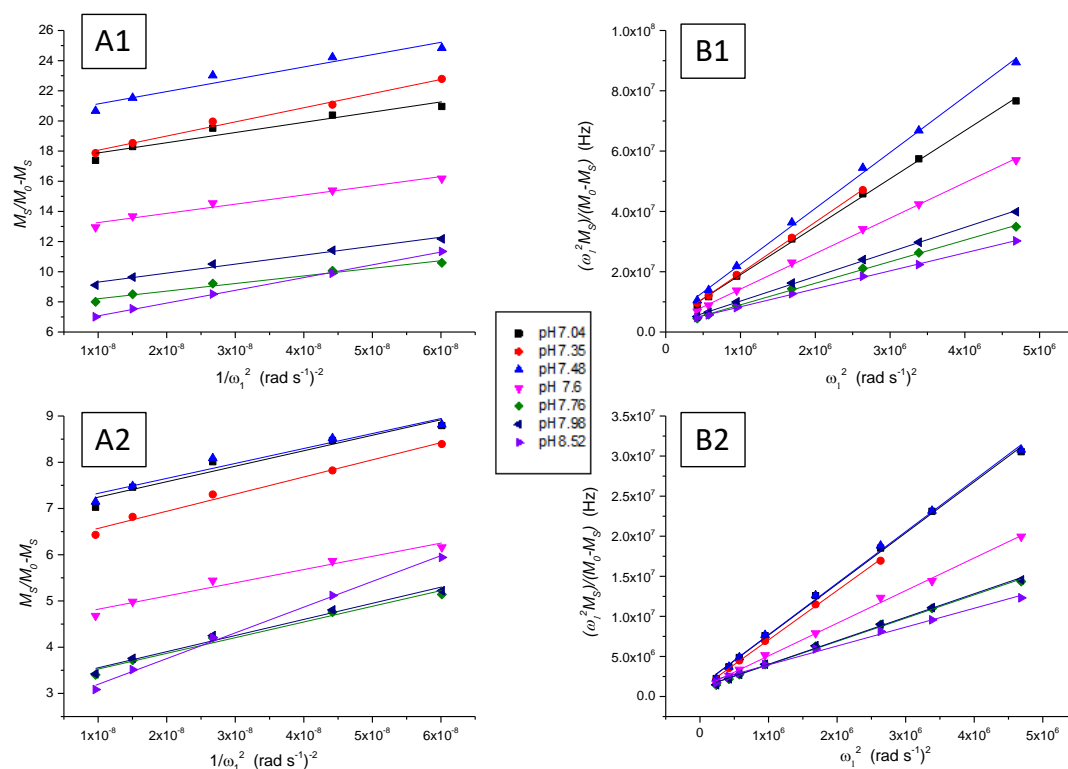


Figure 2.12: Tracés oméga-plot (A) et H-W QUESP (B) pour le complexes **Yb(DO3A-Py-Cbz(5))** à différents pH et pour chacun des deux pics CEST : 24ppm (1) et 13ppm (2). Les lignes en traits pleins représentent les valeurs ajustées.

Complexes de Ln³⁺ comportant un espaceur auto-immolable

Tableau 2.3 : Valeurs moyennes de k_{ex} (s⁻¹) obtenues à 298K pour le complexe **Yb(DO3A-Py-Cbz(5))**

Yb(DO3A-Py-Cbz(5))		k_{ex} (s ⁻¹)
pH	Moyenne des méthodes oméga-plot et H-W QUESP	
Pic à 24ppm	7.04	2400±400
	7.35	2400±100
	7.48	2400±400
	7.60	2500±300
	7.76	2900±400
	7.98	2900±300
	8.52	3800±200
	Pic à 13ppm	7.04
7.35		2400±100
7.48		2500±400
7.60		2800±300
7.76		3500±300
7.98		4600±400
8.52	4900±400	

2.4.3.2. k_{ex} du complexe Yb(DO3A-Py-NH₂(5))

Les **figures 2.13** représentent les tracés linéaires des méthodes analytiques oméga-plot et HW-QUESP, les droites obtenues avec les points expérimentaux ont été ajustées pour obtenir les valeurs de k_{ex} détaillées dans le **tableau 2.4**.

Les valeurs de k_{ex} obtenues avec la méthode oméga-plot sont comparables à celles obtenues par la méthode HW-QUESP permettant alors de calculer un k_{ex} moyen.

Chapitre 2

Etant donné la proximité du pic de l'effet CEST généré par l'isomère TSAP (7ppm) avec celui de l'eau, il est difficile d'obtenir des valeurs de k_{ex} fiables en fonction du pH. Malgré tout, des valeurs de constante de vitesse d'échange acceptables ont pu être déterminées pour certains pH. Tout comme les valeurs de k_{ex} obtenues pour l'isomère TSAP, les valeurs de constante de vitesse de l'isomère SAP (à 16ppm) démontrent également une dépendance avec le pH. La tendance montre une diminution des valeurs de k_{ex} lorsque le pH augmente. Ainsi, l'intensité de l'effet CEST et la valeur de k_{ex} sont affectées de la même manière par l'augmentation du pH. Les valeurs de k_{ex} ici reportées sont du même ordre de grandeur (10^3 s^{-1}) que celles reportées dans la littérature pour les amines. C'est le cas des protons amine des lysines dont le k_{ex} est reporté à 4000s^{-1} (36°C , pH7.0) [25], et du complexe d'Ytterbium possédant deux protons amine échangeables reporté par Chauvin *et. al.* ($k_{ex} = 1700 \pm 500\text{s}^{-1}$ et $k_{ex} = 2200 \pm 500\text{s}^{-1}$ (37°C , pH7.4)) [19].

On peut remarquer que la valeur de k_{ex} est sensiblement plus élevée pour l'isomère TSAP que pour l'isomère SAP (16ppm), à un pH donné. Ces observations semblent logiques compte tenu du fait que le proton labile est plus éloigné du centre métallique dans le cas de l'isomère TSAP, il est alors attendu un échange plus lent que pour l'isomère SAP.

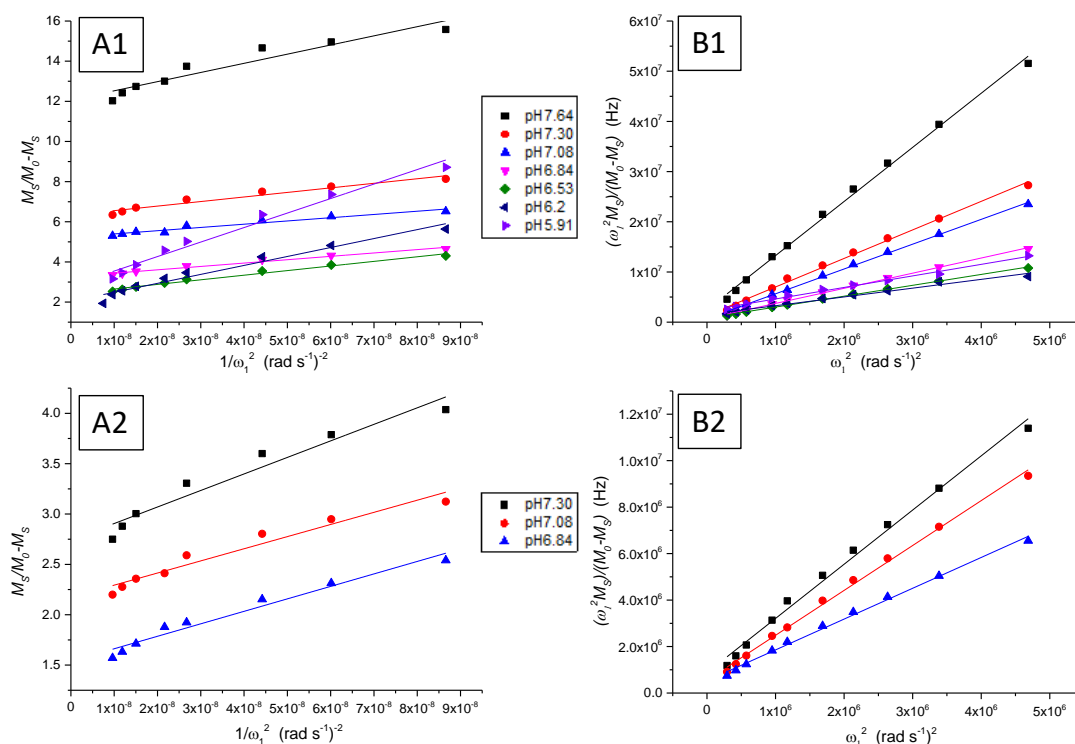


Figure 2.13 : Tracés oméga-plot (A) et H-W QUESP (B) pour le complexes **Yb(DO3A-Py-NH₂(5))** à différents pH et pour chacun des deux pics CEST : 16ppm (1) et 7ppm (2). Les lignes en traits pleins représentent les valeurs calculées.

Tableau 2.4 : Valeurs de k_{ex} (s⁻¹) obtenues à 298K pour le complexe **Yb(DO3A-Py-NH₂(5))**

Yb(DO3A-Py-NH ₂ (5))	pH	k_{ex} (s ⁻¹)
		Moyenne des méthodes oméga-plot et H-W QUESP
Pic à 16ppm	7.64	2500±500
	7.30	2500±600
	7.08	2100±300
	6.84	2700±400
	6.53	3500±400
	6.20	5100±700
	5.91	5700±600
Pic à 7ppm	7.30	3200±700
	7.08	2900±600
	6.84	3400±600

2.4.3.3. Comparaison des k_{ex} des complexes Yb(DO3A-Py-Cbz(5)) et Yb(DO3A-Py-NH₂(5))

Les valeurs de k_{ex} obtenues pour **Yb(DO3A-Py-Cbz(5))** et **Yb(DO3A-Py-NH₂(5))** sont toutes sensiblement affectées par la modification du pH. La **figure 2.14** représente l'évolution du k_{ex} en fonction du pH.

L'évolution des constantes de vitesse d'échange en fonction du pH peut être décrite par **l'équation 2.11** pour laquelle k_0 correspond à la constante de vitesse d'échange de proton spontanée, k_a à la constante de vitesse d'échange acide-catalysée, k_b à la constante de vitesse d'échange base-catalysée et pK_w à la constante d'ionisation de l'eau fixée à une valeur de 14 à 25°C.

$$k_{ex} = k_0 + k_a \times 10^{-pH} + k_b \times 10^{pH-pK_w} \quad (2.11)$$

Chapitre 2

Les valeurs obtenues par ajustement des données par l'équation 2.11 sont répertoriées dans le tableau 2.5.

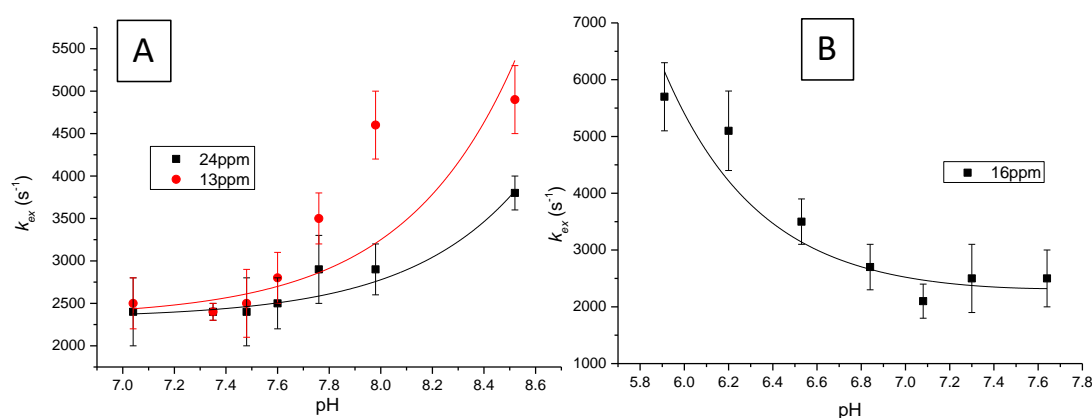


Figure 2.14 : Représentation de l'évolution de la constante de vitesse d'échange en fonction du pH pour le complexe **Yb(DO3A-Py-Cbz(5))**, pour les isomères à 24ppm (tracé en noir) et à 13ppm (tracé en rouge) (A) ainsi que pour les complexes **Yb(DO3A-Py-NH₂(5))** pour l'isomère à 16ppm (B). Les lignes en traits pleins représentent les valeurs calculées.

Tableau 2.5: constantes de vitesse spontanée, base-catalysée, ou acide-catalysée

		k_0 (s ⁻¹)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_b (M ⁻¹ s ⁻¹)
Yb(DO3A-Py-Cbz(5))	13ppm	2560±250	0	$(7.4±1.7) × 10^8$
	24ppm	2350±50	0	$(4.6±0.3) × 10^8$
Yb(DO3A-Py-NH₂(5))	16ppm	2360±290	$(3.0±0.5) × 10^9$	0

Résultats calculées à l'aide de l'équation 2.11

Les valeurs des constantes de vitesse d'échange k_a et k_b montrent la dépendance des vitesses d'échange aux concentrations en ions OH⁻ et H⁺. Les k_{ex} des protons de la fonction carbamate d'**Yb(DO3A-Py-Cbz(5))** augmentent avec le pH et montrent ainsi leur caractère baso catalysé. A l'inverse, l'ajustement des k_{ex} des protons de la fonction amine du complexe **Yb(DO3A-Py-NH₂(5))** montre une constante k_a élevée caractérisant alors des vitesses d'échange acido catalysées.

Complexes de Ln³⁺ comportant un espaceur auto-immolable

La comparaison de ces constantes de vitesse d'échange à un pH donné montre que la valeur de k_0 , caractérisant l'échange spontané, n'est pas négligeable dans la détermination de la vitesse totale devant k_a et k_b pour **Yb(DO3A-Py-NH₂(5))** et **Yb(DO3A-Py-Cbz(5))** respectivement (**tableau 2.6**). Cependant, l'importance du terme k_a sur l'influence de la vitesse totale augmente avec la diminution du pH et devient prépondérante à pH 6, dans le cas de **Yb(DO3A-Py-NH₂(5))**. Concernant **Yb(DO3A-Py-Cbz(5))**, le terme k_b prend de l'importance sur la vitesse totale lorsque le pH diminue, néanmoins, même à pH 8, k_0 reste supérieur à k_b d'un facteur 3.5. Il faudrait atteindre pH 8.6 pour que k_b soit supérieur à la constante d'échange spontanée (k_0) sur la détermination de la vitesse totale.

Tableau 2.6 : Comparaison des contributions k_0 , $k_a \times [H^+]$ et $k_b \times [OH^-]$ à la constante de vitesse à pH

		6, 7 et 8		
		k_0 (s ⁻¹)	$k_a \times [H^+]$ (s ⁻¹)	$k_b \times [OH^-]$ (s ⁻¹)
Yb(DO3A-Py-Cbz(5))	13ppm	2560	0	pH 6 : 7.4
				pH 7 : 74
				pH 8 : 740
Yb(DO3A-Py-NH₂(5))	16ppm	2360	pH 6 : 3000 pH 7 : 300 pH 8 : 30	0

Ainsi, les protons amides possèdent une vitesse d'échange baso catalysée et à l'inverse les protons de groupement amine ont une vitesse d'échange acido catalysée. L'augmentation des valeurs de k_{ex} du proton carbamate lorsque le pH augmente correspond à la tendance généralement observée pour des protons amide, alors que la diminution des valeurs de k_{ex} pour des protons amine lorsque le pH augmente rejoint ce qui est observé dans la littérature [18,25,26].

Les différences de variation de l'effet CEST en fonction du pH pour les complexes **Yb(DO3A-Py-Cbz(5))** et **Yb(DO3A-Py-NH₂(5))** peuvent être exploitées pour leur utilisation en tant qu'agent de contraste activable.

Chapitre 2

En supposant que les complexes possédant le substrat de l'enzyme se comportent comme le composé modèle **Yb(DO3A-Py-Cbz(5))**, la coupure du substrat par l'enzyme permettrait d'observer la disparition de l'effet CEST pour des valeurs de pH comprises entre 8.5 et 7 (effet on/off), et à l'inverse, d'observer l'apparition de l'effet CEST pour des valeurs de pH comprises entre 7 et 6 (effet off/on) (**figure 2.15**). Ceci peut être intéressant dans le cas des tissus cancéreux qui présentent souvent un milieu plus acide que le pH physiologique. Dans cet exemple, l'apparition du signal CEST pourrait être indicateur de la coexistence de deux paramètres, tous deux marqueurs de tissu cancéreux : le pH acide et la présence d'une enzyme spécifique, lié au cancer (par exemple l'urokinase, la cathepsine, etc). Cette approche, mettant en jeu la détection de deux facteurs simultanés, peut conduire à une réponse IRM plus sûre pour la visualisation des tissus cancéreux.

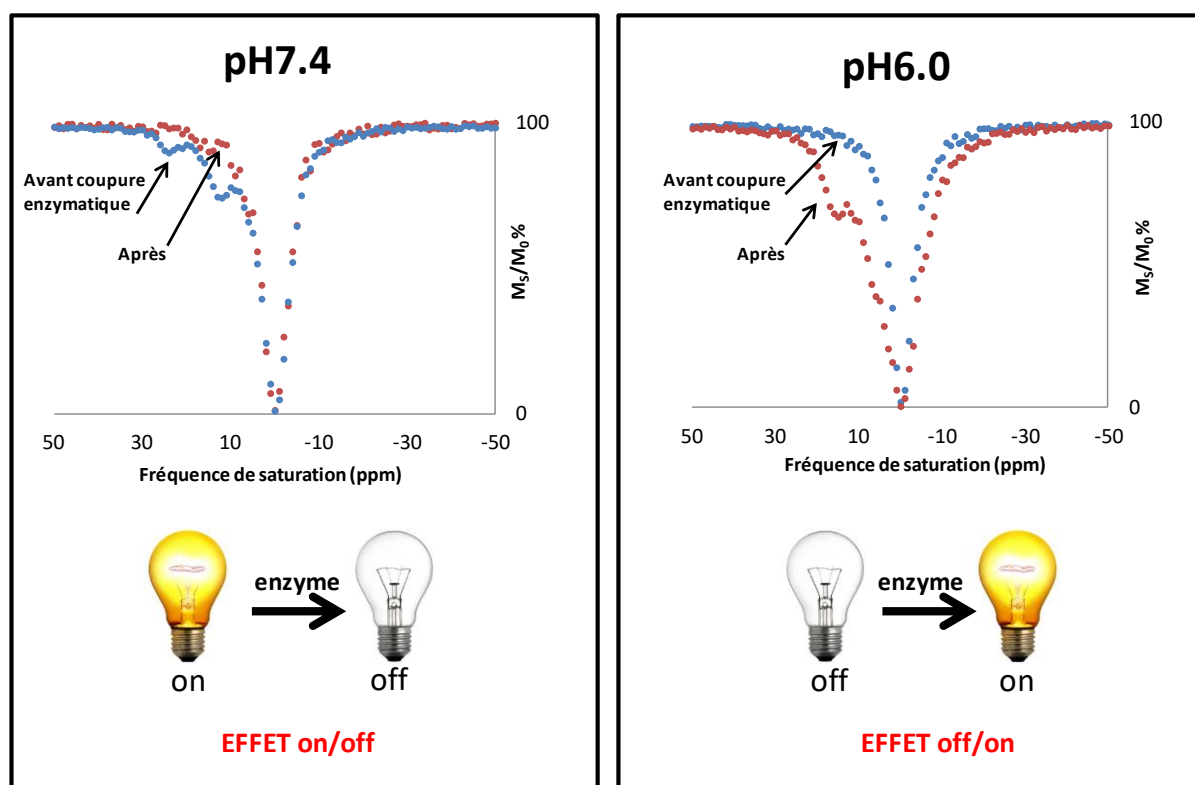


Figure 2.15 : Schéma représentant l'effet attendu de la réaction enzymatique sur le contraste en fonction du pH. Spectres CEST : avant coupure enzymatique (●) et après coupure enzymatique (●) (298 K, 20 mM)

2.5. Coupure enzymatique

Dans le but de vérifier les résultats obtenus avec les composés modèles **Yb(DO3A-Py-Cbz(5))** et **Yb(DO3A-Py-NH₂(5))** montrant l'intérêt potentiel de ces complexes comme agents de contraste, des essais enzymatiques ont été réalisés.

L'étude de la coupure enzymatique par la β -galactosidase a été réalisée en suivant l'évolution de l'effet CEST pour le composé **Yb(DO3A-Py-Gal(5))** et de la relaxivité pour le complexe **Gd(DO3A-Py-Gal(5))**.

Le ligand **DO3A-Py-Gal(5)** est un analogue du composé modèle **DO3A-Py-Cbz(5)** dont le carbamate de benzyle est substitué en position para par un motif β -D-galactopyranoside, substrat de la β -galactosidase (**figure 2.16**). Le mécanisme d'activation de la sonde attendu est le suivant : l'hydrolyse de la liaison glycosidique de **Yb(DO3A-Py-Gal(5))**, catalysée par la β -galactosidase, produit un carbamate de *p*-hydroxybenzyl instable qui subit un processus d'autodestruction et conduit à la libération du complexe sous la forme **YbLNH₂(5)**.

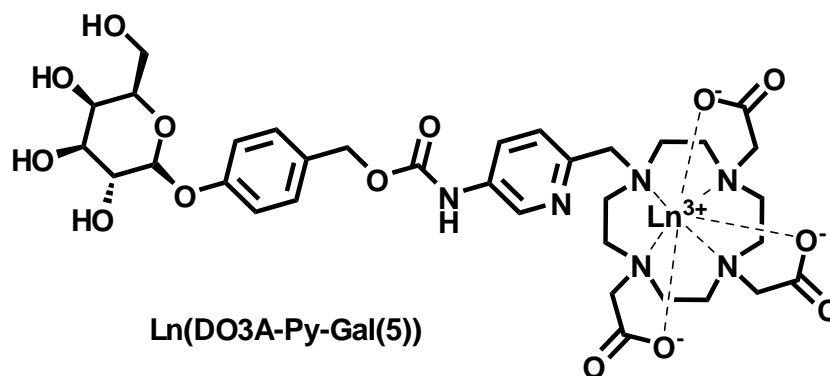


Figure 2.16 : Structure du complexe **Ln(DO3A-Py-Gal(5))** utilisé pour les essais de coupure enzymatique avec la β -galactosidase. Ln³⁺=Gd³⁺, Yb³⁺

2.5.1. Suivi de la réaction enzymatique par paraCEST

L'étude de la coupure enzymatique sur le composé **Yb(DO3A-Py-Gal(5))** a été réalisée à deux pH différents : pH=7.5 pour suivre la disparition des effets CEST à 24 et 13ppm et à pH=6.2 où l'apparition d'un pic CEST à 16ppm est attendue.

Pour chacun des deux pH étudiés, un spectre CEST a été mesuré avant et après réaction enzymatique par application d'une fréquence de saturation par incréments de 0.5ppm entre -50 et +50ppm (**figure 2.17**). Les effets CEST observés avant et après coupure enzymatique sont conformes à ce qui a été observé pour les composés modèles **Yb(DO3A-Py-Cbz(5))** et **Yb(DO3A-Py-NH₂(5))**.

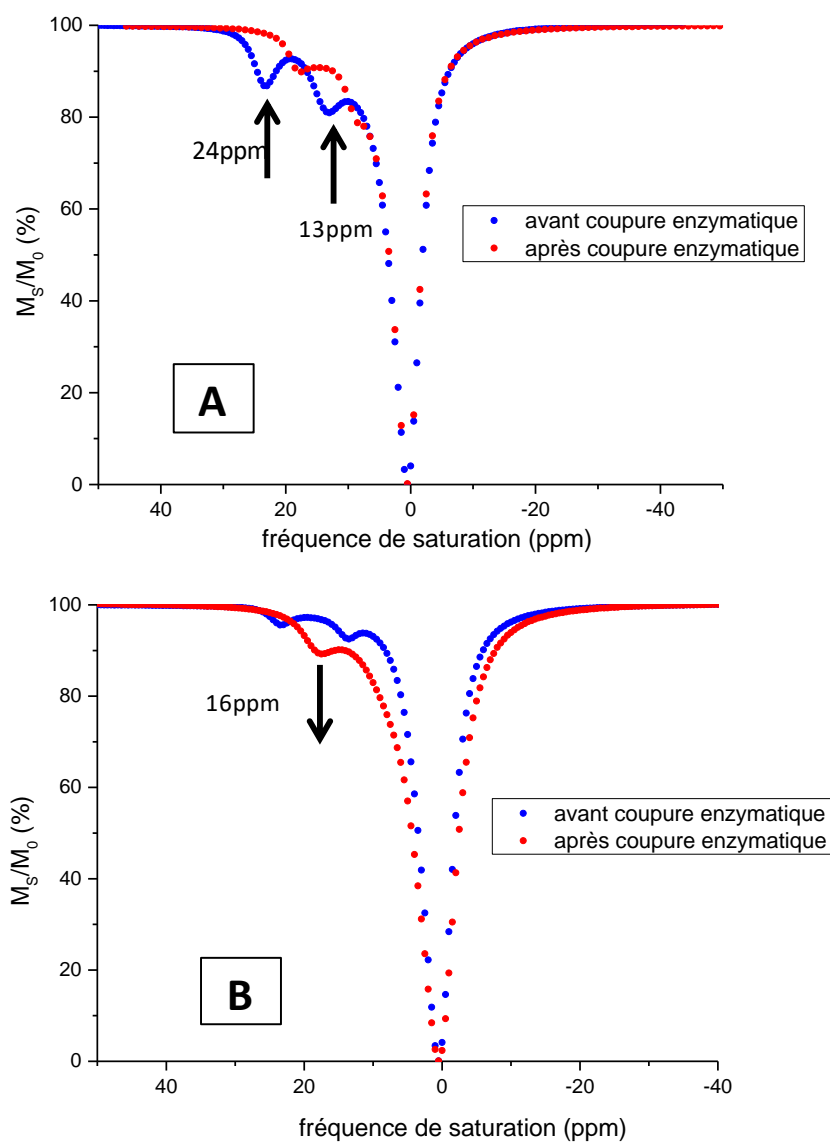


Figure 2.17 : Spectres CEST enregistrés pour **Yb(DO3A-Py-Gal(5))** avant (●) et après (●) coupure enzymatique à pH 7.5 (A) et pH 6.2 (B), et 37°C.

Complexes de Ln³⁺ comportant un espaceur auto-immolable

La cinétique de coupure enzymatique a été suivie en mesurant l'intensité du signal M_s/M_0 en fonction du temps pour une solution d'**Yb(DO3A-Py-Gal(5))** à 20mM dans 0.5mL de tampon phosphate (50 mM) contenant 7mg/mL de BSA (Albumine de Sérum Bovin), avec ajout de 15U de β -galactosidase à une température constante de 37°C.

A pH 7.5, la cinétique de coupure a été suivie en mesurant au cours du temps l'intensité de l'effet CEST obtenu en appliquant une fréquence de saturation à 13 et 24ppm.

L'ajustement des exponentielles ainsi obtenues à l'**équation 2.12** donne accès à la constante de vitesse k_{obs} telles que $k_{obs}=9.67\times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2}=12\text{min}$) pour l'isomère à 24ppm et $k_{obs}=6.25\times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2}=18\text{min}$) pour l'isomère à 13ppm (**figure 2.18 (A) et (B)**).

$$\%CEST = e^{-k_{obs}t} \quad (2.12)$$

A pH 6.2, la cinétique de coupure a été suivie en mesurant au cours du temps l'intensité de l'effet CEST obtenue en appliquant une fréquence de saturation à 16ppm. L'ajustement de l'exponentielle obtenue donne $k_{obs}=2.43\times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2}=47\text{min}$) (**figure 2.18 (C)**).

Les $t_{1/2}$ ont été calculés en considérant une réaction de pseudo-premier ordre selon l'**équation 2.13**.

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_{obs}} \quad (2.13)$$

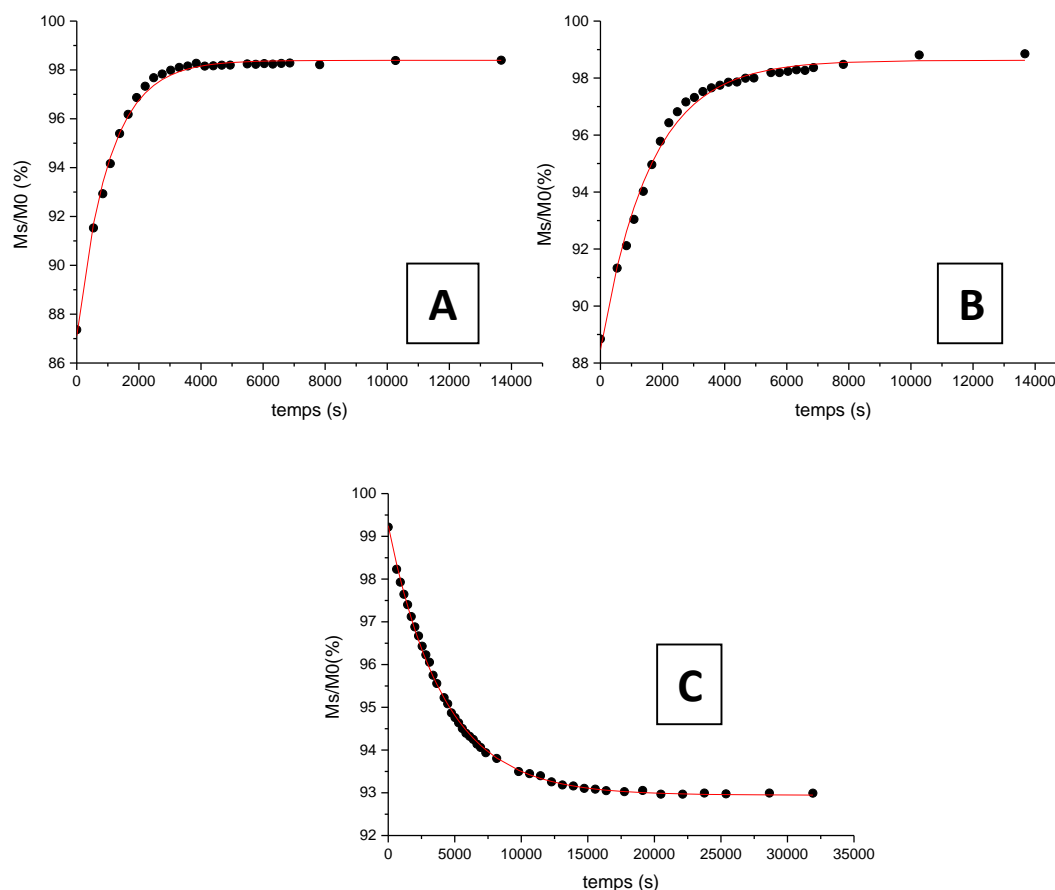


Figure 2.18 : Cinétique de coupure enzymatique du composé **Yb(DO3A-Py-Gal(5))** à pH 7.5 obtenue par saturation du signal à 24ppm (A) et 13ppm (B), et à pH 6.2 obtenue par saturation du signal à 16ppm (C), les lignes rouges correspondent aux valeurs calculées.

A pH 7.5, la coupure enzymatique est presque 1.5 fois plus rapide pour l'isomère à 24ppm que pour celui à 13 ppm, laissant supposer que la conformation de ce dernier offre une meilleure accessibilité du substrat pour l'enzyme. Cette observation est vraie à condition que l'hydrolyse enzymatique soit l'étape limitante de tout le processus. Ce raisonnement suppose également que l'échange entre les deux isomères soit un processus lent.

Il n'est pas surprenant que la coupure enzymatique soit plus lente à pH 6.2 qu'à pH 7.5 étant donné que l'activité de l'enzyme est maximale pour un pH compris entre 7 et 7.5 [27,28].

L'étude de la coupure enzymatique du substrat par la β -galactosidase a permis de vérifier les résultats obtenus avec les composés modèles **Yb(DO3A-Py-Cbz(5))** et **Yb(DO3A-Py-NH₂(5))**, montrant que le composé **Yb(DO3A-Py-Gal(5))** agit à pH 7.5 comme sonde "on/off" et comme sonde "off/on" à pH 6.2.

2.5.2. Suivi de la réaction enzymatique par relaxivité

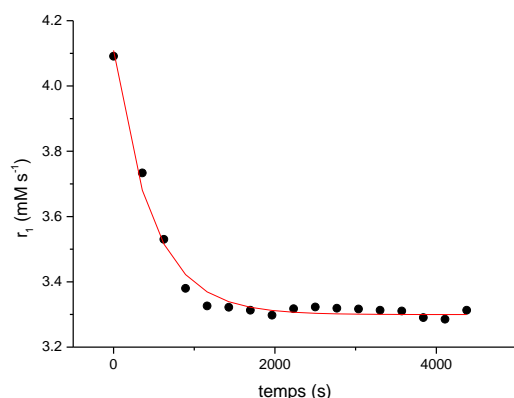


Figure 2.19 : Cinétique de coupure enzymatique obtenue pour le composé **Gd(DO3A-Py-Gal(5))** par mesure de la relaxivité à 37°C, pH 7.5 et 20MHz.

La coupure enzymatique a également été suivie par mesure de la relaxivité (**figure 2.19**) pour une solution de **Gd(DO3A-Py-Gal(5))** à 1mM dans 0.5 mL de tampon phosphate 50 mM (0.1 M Na₂HPO₄ + 0.1 M KH₂PO₄) pH7.5, contenant 7 mg/mL de BSA, avec ajout de 6U de β -galactosidase à une température constante de 37°C.

L'action de la β -galactosidase se traduit par une diminution de la relaxivité de 4.1mM s⁻¹ à 3.3 mM s⁻¹ soit une diminution de la relaxivité de l'ordre de 20%, conformément à ce qui a été montré avec les composés modèles **Gd(DO3A-Py-Cbz(5))** et **Gd(DO3A-Py-NH₂(5))**.

Ce résultat confirme que la coupure enzymatique est bien suivie de l'autodestruction de l'espaceur et de la libération de la sonde sous forme d'amine. Pour cette réaction, la constante de vitesse déterminée est : $k_{obs}=2.12 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2}=5.4 \text{ min}$).

Les vitesses reportées ici sont difficiles à comparer directement à celle obtenue avec la sonde **YbL** ($4 \times 10^{-5} \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{U}^{-1}$) [9] (**figure 2.20**) car les mesures n'ont pas été faites dans les mêmes conditions et la concentration individuelle des deux isomères est inconnue. Dans le cas du composé **YbL**, l'espaceur auto-immolable est relié au DO3A par l'intermédiaire d'un motif α -amino glycine au lieu d'une 5-amino-2-méthylpyridine.

Chapitre 2

Il est possible que la partie chélate de la sonde puisse avoir un effet sur l'efficacité du processus d'activation médié par l'enzyme, mais cet effet ne représentera sûrement pas des ordres de grandeur de différence dans la cinétique.

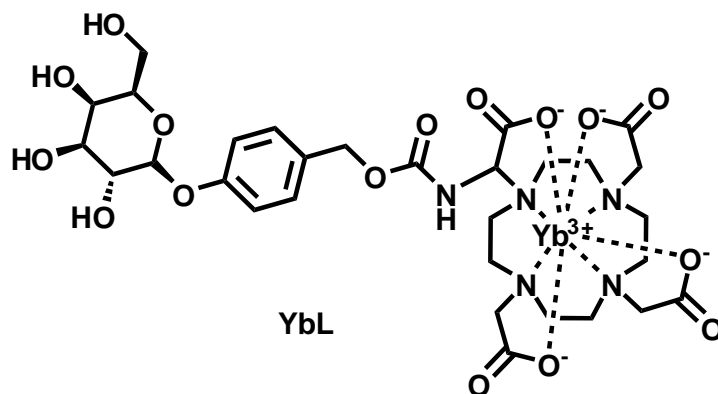


Figure 2.20: Structure du complexe YbL [9]

2.6. Conclusion

Nous avons montré au travers de ce chapitre l'importance de la structure moléculaire des complexes de lanthanide sur leur relaxivité ou leur capacité à générer un effet paraCEST.

La proximité de l'espaceur auto-immolable avec l'azote hétérocyclique coordinant sur le noyau pyridinique favorise à la fois la coordination du carbamate sur le métal, permettant des changements importants de relaxivité après coupure enzymatique grâce à un changement de nombre d'hydratation (sur le complexe de Gd³⁺), mais aussi le rapprochement des protons labiles du centre métallique et l'apparition d'effet de transfert de saturation (sur le complexe d'Yb³⁺).

Bien que le composé **Gd(DO3A-Py-Gal(6))**, pour lequel le carbamate est coordonné au métal, présente les meilleures propriétés de relaxivité pour le suivi de la réaction enzymatique (augmentation de r_1 de 52%), il ne permet pas, dans les faits, une réaction de coupure enzymatique totale ayant une cinétique qui serait compatible avec une utilisation pratique. En effet, la coordination du carbamate au métal perturbe le processus d'autodestruction de l'espaceur dont une partie reste lié au cation métallique (résultat non publié). A l'inverse, la conversion de **Gd(DO3A-Py-Gal(5))** en **Gd(DO3A-Py-NH₂(5))**, médiée par la réaction enzymatique, est complète et s'accompagne d'une diminution de la relaxivité de 20% ce qui peut être détectable sur les images IRM.

De plus, l'absence de coordination de l'espaceur dans le cas de **Yb(DO3A-Py-Gal(5))** apporte de la flexibilité et permet l'existence de différents isomères en solution possédant des propriétés CEST différentes. Nous avons montré que ce composé pouvait être utilisé comme sonde "off/on" pour des pH élevés (pH 9-7) et comme sonde "on/off" pour des pH plus acide (pH=6-7) pour la détection de l'activité de la β -galactosidase.

Ces complexes possèdent donc des propriétés enzymatiques intéressantes qui peuvent être suivies à la fois en IRM T₁ ou paraCEST.

Des études supplémentaires pourront être mises en place afin de valider les propriétés de ces composés *in-vivo*. Par exemple, les différences d'effet CEST observés en fonction du pH pourraient être exploitées dans le cadre de la détection de l'activité d'enzymes dans les tissus cancéreux où le pH est généralement plus acide que dans les tissus sains [29].

2.7. Références

- (1) Delli Castelli, D.; Terreno, E.; Aime, S.: YbIII-HPDO3A: A Dual pH- and Temperature-Responsive CEST Agent. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 1798-1800.
- (2) Hingorani, D. V.; Bernstein, A. S.; Pagel, M. D.: A review of responsive MRI contrast agents: 2005–2014. *Contrast media & molecular imaging* **2015**, *10*, 245-265.
- (3) Hingorani, D. V.; Yoo, B.; Bernstein, A. S.; Pagel, M. D.: Detecting Enzyme Activities with Exogenous MRI Contrast Agents. *Chemistry – A European Journal* **2014**, *20*, 9840-9850.
- (4) Heffern, M. C.; Matosziuk, L. M.; Meade, T. J.: Lanthanide Probes for Bioresponsive Imaging. *Chemical Reviews* **2014**, *114*, 4496-4539.
- (5) Bonnet, C.; Tóth, E.: Smart Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *Chimia* **2016**, *70*, 102-108.
- (6) Bonnet, C. S.; Tei, L.; Botta, M.; Toth, E.: Responsive Probes. In *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*; John Wiley & Sons, Ltd, **2013**; pp 343.
- (7) Duimstra, J. A.; Femia, F. J.; Meade, T. J.: A Gadolinium Chelate for Detection of β -Glucuronidase: A Self-Immolative Approach. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 12847-12855.
- (8) Keliris, A.; Mamedov, I.; Hagberg, G. E.; Logothetis, N. K.; Scheffler, K.; Engelmann, J.: A smart ¹⁹F and ¹H MRI probe with self-immolative linker as a versatile tool for detection of enzymes. *Contrast media & molecular imaging* **2012**, *7*, 478-483.
- (9) Chauvin, T.; Durand, P.; Bernier, M.; Meudal, H.; Doan, B.-T.; Noury, F.; Badet, B.; Beloeil, J.-C.; Tóth, É.: Detection of Enzymatic Activity by PARACEST MRI: A General Approach to Target a Large Variety of Enzymes. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 4370-4372.
- (10) He, J.; Bonnet, C. S.; Eliseeva, S. V.; Lacerda, S.; Chauvin, T.; Retailleau, P.; Szeremeta, F.; Badet, B.; Petoud, S.; Tóth, É.; Durand, P.: Prototypes of Lanthanide(III) Agents Responsive to Enzymatic Activities in Three Complementary Imaging Modalities: Visible/Near-Infrared Luminescence, PARACEST-, and T1-MRI. *Journal of the American Chemical Society* **2016**.
- (11) E.Toth; Helm, L.; Merbach, A.: Relaxivity of Gadolinium(III) Complexes: Theory and Mechanism. In *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*; John Wiley & Sons, Ltd, **2013**; pp 25.
- (12) Horrocks, W. D.; Sudnick, D. R.: Lanthanide ion probes of structure in biology. Laser-induced luminescence decay constants provide a direct measure of the number of metal-coordinated water molecules. *Journal of the American Chemical Society* **1979**, *101*, 334-340.
- (13) Supkowski, R. M.; Horrocks Jr, W. D.: On the determination of the number of water molecules, q, coordinated to europium(III) ions in solution from luminescence decay lifetimes. *Inorganica Chimica Acta* **2002**, *340*, 44-48.
- (14) Beeby, A.; M. Clarkson, I.; S. Dickins, R.; Faulkner, S.; Parker, D.; Royle, L.; S. de Sousa, A.; A. Gareth Williams, J.; Woods, M.: Non-radiative deactivation of the excited states of europium, terbium and ytterbium complexes by proximate energy-matched OH, NH and CH oscillators: an improved luminescence method for establishing solution hydration states. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **1999**, 493-504.
- (15) Peters, J. A.; Huskens, J.; Raber, D. J.: Lanthanide induced shifts and relaxation rate enhancements. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **1996**, *28*, 283-350.
- (16) Mayer, F.; Platas-Iglesias, C.; Helm, L.; Peters, J. A.; Djanashvili, K.: ¹⁷O NMR and Density Functional Theory Study of the Dynamics of the Carboxylate Groups in DOTA Complexes of Lanthanides in Aqueous Solution. *Inorganic Chemistry* **2012**, *51*, 170-178.
- (17) Stevens, T. K.; Milne, M.; Elmehriki, A. A. H.; Suchý, M.; Bartha, R.; Hudson, R. H. E.: A DOTAM-based paraCEST agent favoring TSAP geometry for enhanced amide proton chemical shift dispersion and temperature sensitivity. *Contrast media & molecular imaging* **2013**, *8*, 289-292.
- (18) Terreno, E.; Castelli, D. D.; Cravotto, G.; Milone, L.; Aime, S.: Ln(III)-DOTAMgly Complexes: A Versatile Series to Assess the Determinants of the Efficacy of Paramagnetic Chemical

Complexes de Ln³⁺ comportant un espaceur auto-immolable

Exchange Saturation Transfer Agents for Magnetic Resonance Imaging Applications. *Investigative Radiology* **2004**, *39*, 235-243.

(19) Chauvin, T.; Torres, S.; Rosseto, R.; Kotek, J.; Badet, B.; Durand, P.; Tóth, É.: Lanthanide(III) Complexes That Contain a Self-Immolative Arm: Potential Enzyme Responsive Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *Chemistry – A European Journal* **2012**, *18*, 1408-1418.

(20) Zhang, S.; Michaudet, L.; Burgess, S.; Sherry, A. D.: The Amide Protons of an Ytterbium(III) dota Tetraamide Complex Act as Efficient Antennae for Transfer of Magnetization to Bulk Water. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 1919-1921.

(21) Aime, S.; Botta, M.; Fasano, M.; Marques, M. P. M.; Geraldes, C. F. G. C.; Pubanz, D.; Merbach, A. E.: Conformational and Coordination Equilibria on DOTA Complexes of Lanthanide Metal Ions in Aqueous Solution Studied by ¹H-NMR Spectroscopy. *Inorganic chemistry* **1997**, *36*, 2059-2068.

(22) McMahon, M. T.; Gilad, A. A.; Zhou, J.; Sun, P. Z.; Bulte, J. W. M.; van Zijl, P. C. M.: Quantifying exchange rates in chemical exchange saturation transfer agents using the saturation time and saturation power dependencies of the magnetization transfer effect on the magnetic resonance imaging signal (QUEST and QUESP): Ph calibration for poly-L-lysine and a starburst dendrimer. *Magnetic Resonance in Medicine* **2006**, *55*, 836-847.

(23) Dixon, W. T.; Ren, J.; Lubag, A. J.; Ratnakar, J.; Vinogradov, E.; Hancu, I.; Lenkinski, R. E.; Sherry, A. D.: A concentration-independent method to measure exchange rates in PARACEST agents. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* **2010**, *63*, 625-32.

(24) Randtke, E. A.; Chen, L. Q.; Corrales, L. R.; Pagel, M. D.: The Hanes-Woolf linear QUESP method improves the measurements of fast chemical exchange rates with CEST MRI. *Magnetic Resonance in Medicine* **2014**, *71*, 1603-1612.

(25) Liepinsh, E.; Otting, G.: Proton exchange rates from amino acid side chains—implications for image contrast. *Magnetic Resonance in Medicine* **1996**, *35*, 30-42.

(26) Liu, G.; Li, Y.; Pagel, M. D.: Design and characterization of a new irreversible responsive PARACEST MRI contrast agent that detects nitric oxide. *Magnetic Resonance in Medicine* **2007**, *58*, 1249-1256.

(27) Kubly, S. A.; Lardy, H. A.: Purification and Kinetics of β-D-Galactosidase from *Escherichia coli*, Strain K-121,2. *Journal of the American Chemical Society* **1953**, *75*, 890-896.

(28) Tenu, J.-P.; Viratelle, O. M.; Garnier, J.; Yon, J.: pH Dependence of the Activity of β-Galactosidase from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry* **1971**, *20*, 363-370.

(29) Tannock, I. F.; Rotin, D.: Acid pH in Tumors and Its Potential for Therapeutic Exploitation. *Perspectives in Cancer Research* **1989**, *49*, 4373-4384.

Chapitre 3

Etudes de la stabilité thermodynamique et
de l'inertie cinétique de complexes de
 Ln^{3+} formés à partir des ligands DO3A-
Py-Cbz(6) et DO3A-Py-NH₂(6)

Chapitre 3

Table des matières

3.1. Introduction.	105
3.2. Propriétés thermodynamiques.	107
3.2.1. Constantes de protonation.	107
3.2.2. Constantes de stabilité.	108
3.3. Propriétés cinétiques.	113
3.3.1. Cinétique de dissociation en milieu acide.	115
3.3.2. Cinétique de dissociation assistée par les ions Cu^{2+} des complexes $[\text{Ce}(\text{DO3A-Py-NH}_2(6))]$ et $[\text{Gd}(\text{DO3A-Py-NH}_2(6))]$.	119
3.4. Conclusion.	121
3.5. Références.	122

3.1. Introduction

L'utilisation *in-vivo* de complexes de lanthanides nécessite que leur intégrité soit conservée aussi longtemps que le complexe est présent dans le corps, étant donné que métal et ligands séparés sont tous deux potentiellement toxiques. Une haute inertie cinétique et stabilité thermodynamique sont les critères les plus importants à respecter, pour utiliser les complexes métalliques en milieu biologique. Les aspects liés à la stabilité des complexes ont été d'un intérêt particulier ces dernières années, notamment pour les complexes de Gd³⁺, suite à la découverte de la Fibrose Néphrogénique Systémique (NSF) [1,2]. Cette maladie, mise en évidence chez des patients présentant un déficit sévère des fonctions rénales, est liée à l'injection d'un agent de contraste IRM à base de Gd³⁺. En plus de la stabilité thermodynamique, l'inertie cinétique des complexes de lanthanide constitue le meilleur indicateur de la toxicité, ou non-toxicité, *in-vivo* de tels composés [3]. Différents paramètres peuvent influencer la dissociation de complexes métalliques dans les fluides biologiques, comme la réaction avec un ion endogène (tel que : Ca²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, etc.), la présence d'un ligand biologique compétiteur (citrate, phosphate, bicarbonate, transferrine, etc.) ou encore l'interaction du complexe de Ln³⁺ avec les protons (provenant de bio-ligands protonés, de protéines, etc.). Les complexes formés à partir de ligands linéaires et macrocycliques possèdent des comportements différents vis-à-vis de leur cinétique de dissociation, dans des conditions proches des conditions physiologiques. Non seulement les complexes formés à partir de ligands macrocycliques (tels que le DOTA et ses dérivés), possèdent une meilleure inertie cinétique que les complexes formés à partir de chélatants acycliques, mais les mécanismes de dissociation de ces complexes sont aussi très différents. Lors de la dissociation de ligands linéaires, le métal, les protons, ainsi que les ligands biologiques sont connus pour jouer un rôle important, alors que, dans le cas des complexes macrocycliques de type DOTA, le mécanisme de dissociation prédominant est la dissociation catalysée par des protons. Mis à part le mécanisme, la vitesse de réaction de dissociation est considérablement plus faible pour les complexes formés à partir de composés macrocycliques (la constante de vitesse de dissociation acido-catalysée est de 0.56 M⁻¹s⁻¹ pour [Gd(DTPA)]²⁻ alors qu'elle est de 1.8×10⁻⁶ M⁻¹s⁻¹ pour le composé [Gd(DOTA)]⁻ [4]). La différence d'inertie entre ces complexes est souvent expliquée en termes de rigidité du ligand qui est supérieure pour les ligands macrocycliques (de type DOTA par exemple). Ce chapitre rapporte l'étude de la stabilité thermodynamique, et de l'inertie cinétique de complexes formés à partir de certains ions lanthanides représentant le début, le milieu et la fin

Chapitre 3

de la série, ainsi que la stabilité des complexes formés à partir des ions métalliques endogènes les plus importants avec les ligands **DO3A-Py-Cbz(6)** et **DO3A-Py-NH₂(6)** (figure 3.1).

Les complexes de lanthanide de ces ligands, déjà présentés dans le chapitre 2, possèdent des propriétés de relaxivité, de paraCEST et de luminescence d'intérêts, en vue d'une utilisation pour la visualisation de l'activité enzymatique par IRM, et par imagerie optique [5]. Ces études ont été réalisées au Département de Chimie Inorganique et Analytique de l'Université de Debrecen, Hongrie, dans le cadre d'une mission scientifique COST.

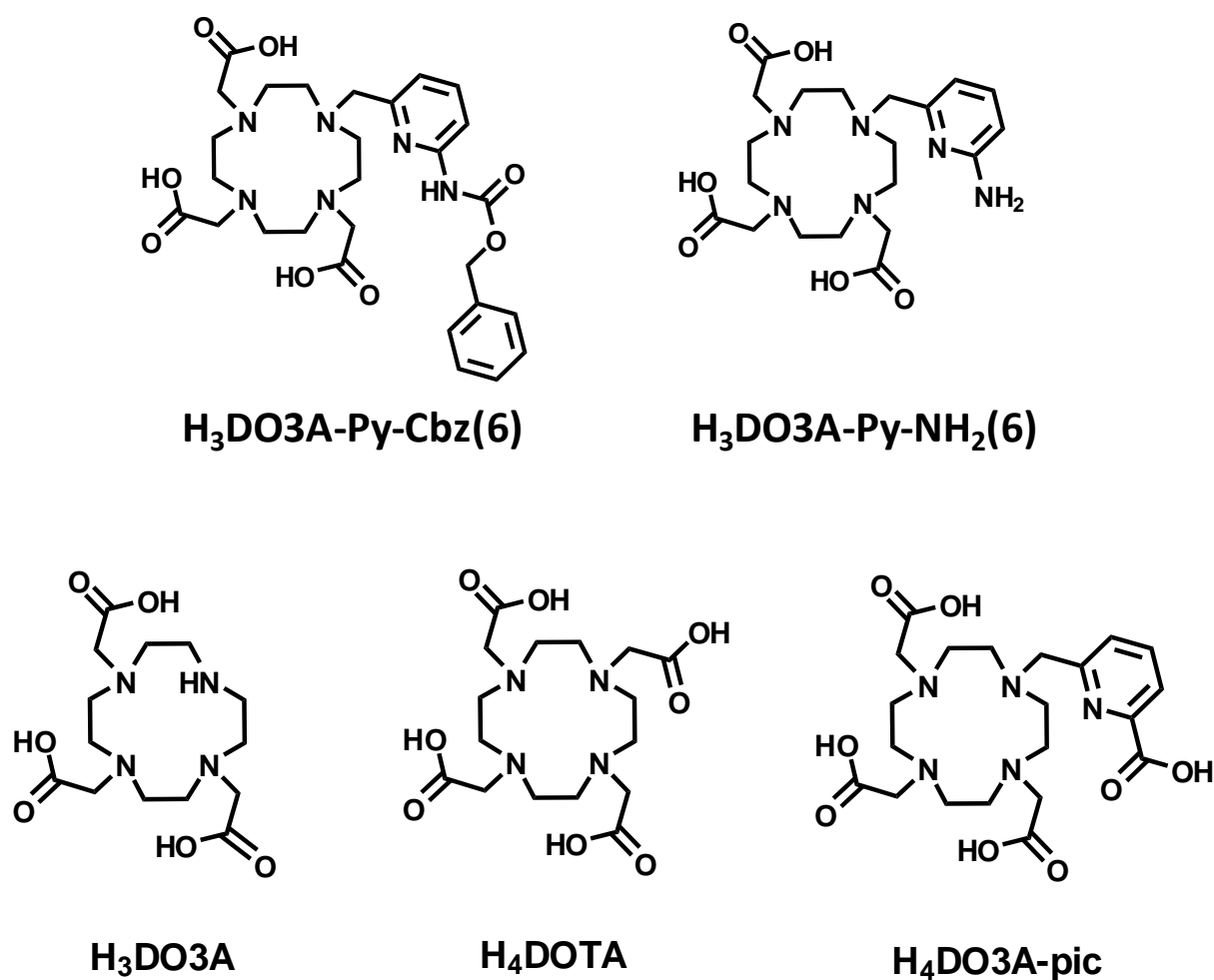


Figure 3.1 : Structure des ligands discutés dans le texte

3.2. Propriétés thermodynamiques

3.2.1. Constantes de protonation

Les constantes de protonations des ligands discutés dans ce chapitre et des ligands de comparaison (H₄DOTA, H₃DO3A et H₄DO3A-pic (**figure 3.1**)) sont données dans le **tableau 3.1**. Les constantes de protonation, définies par l'équation **3.1**, ont été déterminées par titrage de potentiométrie pH à 25°C dans une force ionique NaCl 0.15M.

$$K_i^H = \frac{[H_iL]}{[H_{i-1}L][H^+]} \quad i = 1 - 5 \quad (3.1)$$

Tableau 3.1 Constantes de protonation des ligands

	H ₃ DO3A-Py-Cbz(6)	H ₃ DO3A-Py-NH ₂ (6)	H ₄ DOTA [6] ^a	H ₃ DO3A [7] ^a	H ₃ DO3A-pic [8]
log K_{H1}	8.97(4)	9.12(4)	9.37	10.07	9.21
log K_{H2}	9.24(1)	9.29(2)	9.14	8.93	8.94
log K_{H3}	4.62(3)	7.71(3)	4.63	4.43	4.82
log K_{H4}	3.20(3)	4.26(4)	3.91	4.11	3.52
log K_{H5}	-	2.11(3)	-	1.88	1.39
Σ log K_{Hi}	26.03	32.49	27.05	29.42	27.88

Résultats obtenus à 25°C et I=0.15M NaCl. La déviation standard est représentée entre parenthèse. a : I= 0.1 M NaCl

Pour chacun des ligands présentés, les deux premières constantes de protonation correspondent à la protonation des azotes macrocycliques en position *trans* l'un par rapport à l'autre. La première constante de protonation (log K_{H1}) est légèrement inférieure pour **DO3A-Py-Cbz(6)** et **DO3A-Py-NH₂(6)**, par rapport aux ligands DOTA et DO3A, mais elle est similaire à celle qui est reportée pour DO3A-pic (**tableau 3.1**).

Chapitre 3

Cette différence peut être liée à l'effet électro-attracteur de la fonction 2-méthyl-6-pyridinecarbamate ou 2-méthyl-6-pyridineamine [7], qui entraîne une diminution de la basicité des azotes macrocycliques, de la même manière que ce qui a été décrit lors du remplacement des bras acétates de l'acide nitrilo-triacétique NTA, par des groupements 2-méthyl-6-pyridinecarboxylate du composé H_3tpaa (acide α,α',α'' -nitrilotri(6-méthyl-2-pyridinecarboxylique) [9]. Il faut noter que pour chacun des deux ligands étudiés, la valeur de la première constante de protonation obtenue par l'analyse des données potentiométriques, est inférieure à la valeur de la deuxième constante. Ceci signifie que ces deux premières constantes de protonation sont très proches et elles ne peuvent pas être réellement séparées. Dans ce cas-là, il serait plus juste de présenter la constante cumulée pour les deux premières étapes de protonation, $\log\beta_{H1-2} = \log K_{H1} + \log K_{H2}$. Nous avons malgré tout préféré de les présenter individuellement car cette présentation reflète mieux le fait que chacune des deux étapes de protonation se passe autour de pH 9 – 9.2. Il est également à noter que la valeur de $\log K_{H1}$ est considérablement diminuée dans une force ionique de 0.15 M NaCl, utilisée dans nos études. En effet, avec ces ligands macrocycliques on observe une complexation non-négligeable avec l'ion sodium, comme cela a été démontré régulièrement [10]. Pour calculer une « vraie » constante de protonation en absence de complexation, il aurait fallu utiliser une force ionique avec un cation non-compléxant comme le potassium ou le tétraméthylammonium. Néanmoins, étant donné que ces molécules sont destinées à une utilisation en milieu biologique en présence d'une forte concentration de sodium, il nous semblait plus judicieux de mener nos études avec la même concentration de Na^+ . La troisième constante de protonation $\log K_{H3}$ du ligand **DO3A-Py-NH₂(6)** correspond à la protonation de l'amine du bras 6-amino-2-méthylpyridine, ainsi ce ligand possède un site de protonation supplémentaire en comparaison aux autres ligands. Par conséquent, la basicité totale ($\sum \log K_{Hi}$) de **H₃DO3A-Py-NH₂(6)** est supérieure à celle des autres ligands. Pour chacun des ligands, les deux dernières constantes de protonation correspondent à la protonation des fonctions acétates.

3.2.2. Constantes de stabilité

Les constantes de stabilité ($\log K_{ML}$) et les constantes de protonation ($\log K_{MLHi}$) des complexes, définies par les équations 3.2 et 3.3, sont reportées dans le tableau 3.2. Les courbes de titrage potentiométrique sont montrées dans les figures 3.2 et 3.3.

$$K_{ML} = \frac{[ML]}{[M][L]} \quad (3.2)$$

$$K_M^H = \frac{[MHL]}{[ML][H^+]} \quad (3.3)$$

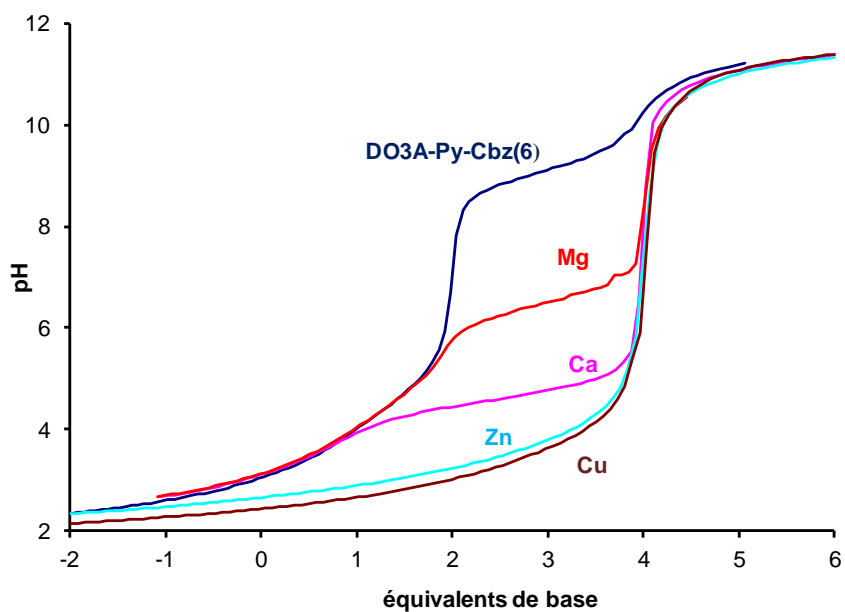


Figure 3.2: Courbes de titrage des solutions de **H₃DO3A-Py-Cbz(6)** (2 mM) avec 0, ou 1 équivalent de MgCl₂, CaCl₂, ZnCl₂ et CuCl₂. I = 0.15M NaCl ; 298 K.

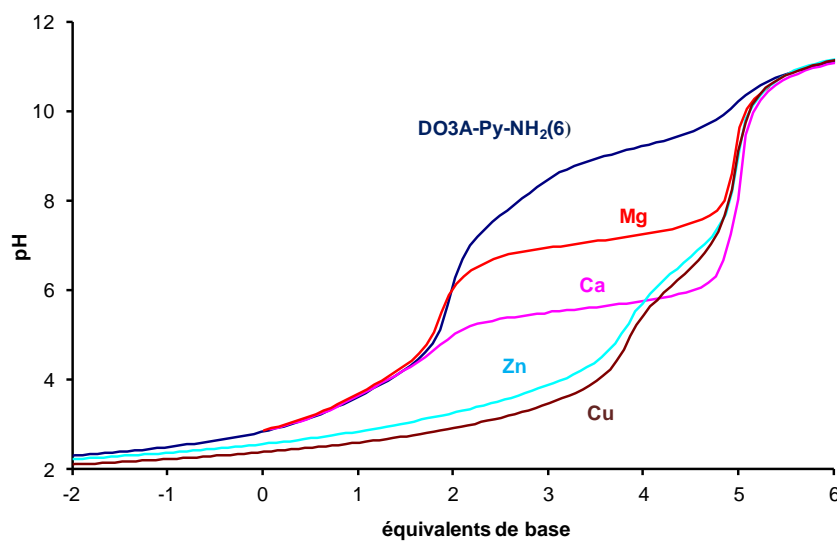


Figure 3.3: Courbes de titrage des solutions de **H₃DO3A-Py-NH₂(6)** (2 mM) avec 0, 1 ou 2 équivalent de MgCl₂, CaCl₂, ZnCl₂ et CuCl₂. I = 0.15M NaCl ; 298 K.

Chapitre 3

Les méthodes standards de titrage pH-potentiométrique (en temps réel) ne sont pas adaptées pour déterminer les constantes de stabilité des complexes $[\text{LnDO3A-Py-Cbz(6)}]$ et $[\text{LnDO3A-Py-NH}_2(6)]$, étant donné que la cinétique de formation de ces complexes est très lente. La méthode « out-of-cell » a alors été utilisée (figures 3.2 et 3.3). En contraste, la formation des complexes de certains cations endogènes, que sont le Zn^{2+} , le Mg^{2+} ou encore le Ca^{2+} est relativement rapide, et a permis la détermination des constantes de stabilité par titrage pH-potentiométrique direct. Les constantes de stabilité des complexes de Cu^{2+} ($[\text{Cu}(\text{DO3A-Py-Cbz(6)})]^-$ et $[\text{Cu}(\text{DO3A-Py-NH}_2(6))]^-$) ont été déterminées en combinant les méthodes de spectroscopie UV-visible et de pH-potentiométrie (figures 3.4 et 3.5). En effet, le titrage UV-Vis est nécessaire pour compléter le dosage pH-potentiométrique, car le Cu^{2+} forme des complexes très stables avec les ligands macrocycliques, dont les formes protonées se forment déjà à un pH très acide, où l'électrode de pH n'est plus fiable (de plus les complexes de Cu^{2+} se forment lentement dans des conditions très acides).

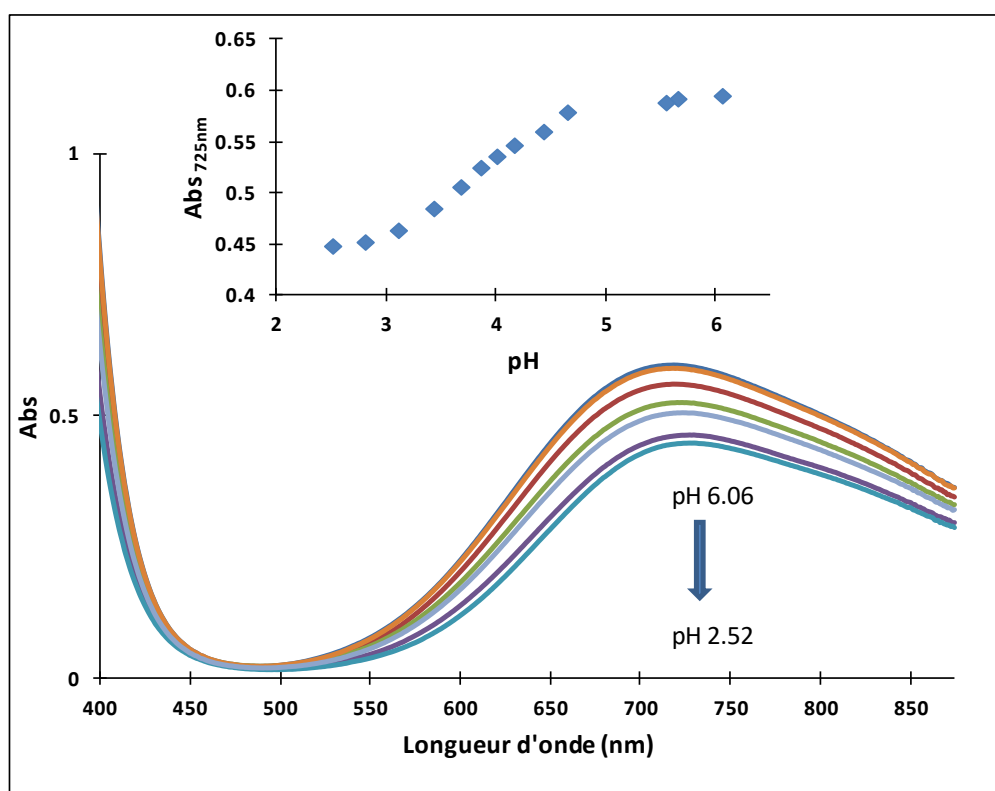


Figure 3.4: Spectre UV-visible de $[\text{Cu}(\text{DO3A-Py-Cbz(6)})]^-$ (1.76mM) en présence de concentrations croissantes de H^+ (pH 6.06, 5.55, 4.44, 3.86, 3.68, 3.11 et 2.52) à 25°C, 1.5M NaCl, l'insertion montre l'absorbance en fonction du pH à $\lambda=725\text{nm}$.

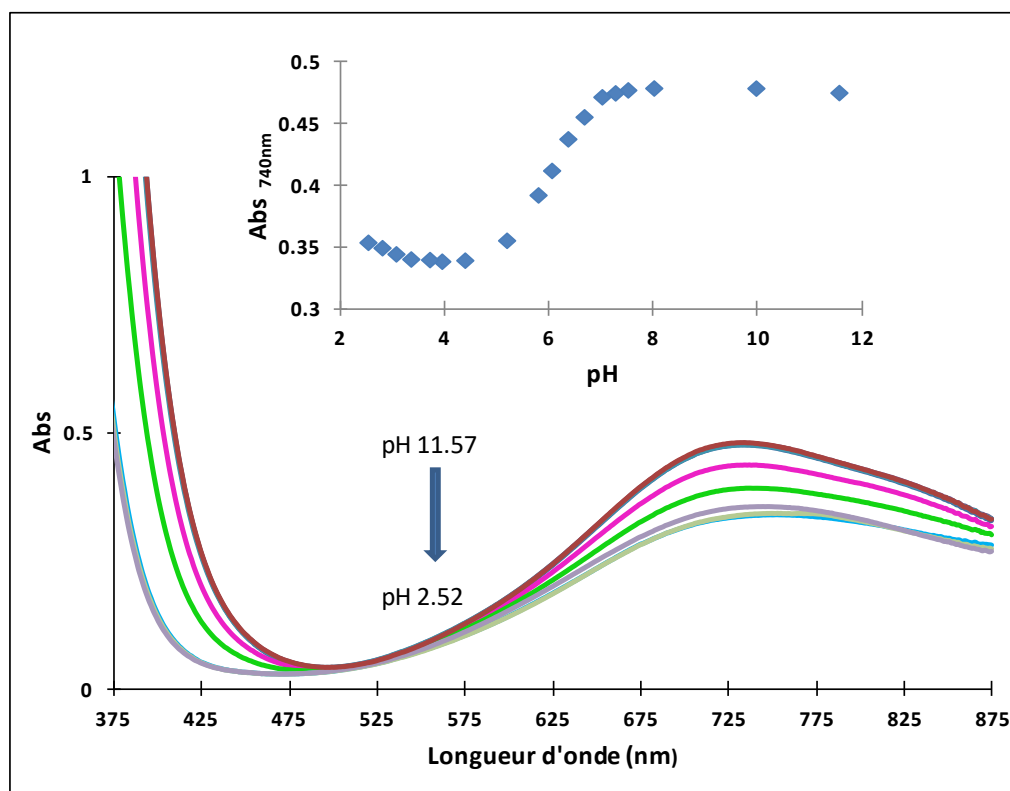


Figure 3.5: Spectre UV-visible de [Cu(DO3A-Py-NH₂(6))] (1.82mM) en présence de concentrations croissantes de H⁺ (pH 11.57, 8.01, 7.51, 7.27, 6.36, 5.79, 4.38, 3.35, 2.52) à 25°C, 1.5M NaCl, l'insertion montre l'absorbance en fonction du pH à λ=740nm.

Tableau 3.2: Constantes de stabilité des complexes

	Zn ²⁺	Cu ²⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Ce ³⁺	Gd ³⁺	Yb ³⁺	pGd
DO3A-Py-NH ₂ (6)	log K _{ML}	16.71(5)	21.24(9) ^d	7.53(1)	11.88 (1)	16.7(2)	18.60(6)	18.16(6)
	log K _{ML} ^H	6.61(3)	5.94(6) ^d	6.87(2)	5.38(4)	4.1(1)	3.92(5)	4.17(5)
	log K _{MLH} ^H	3.98(2)	3.14(8) ^d	-	-	-	-	-
	log K _{MLH2} ^H	2.97(3)	2.97(3) ^d	-	-	-	-	-
DO3A-Py-Cbz(6)	log K _{ML}	16.86(2)	20.85(3) ^d	7.85(1)	11.77(1)	18.74(4)	20.16(4)	21.05(10)
	log K _{ML} ^H	3.87(2)	3.54(4) ^d	-	4.16(2)	-	-	-
	log K _{MLH} ^H	2.93(2)	2.96(3) ^d	-	-	-	-	-
	log K _{MLH2} ^H	-	-	-	-	-	-	-
DO3A	log K _{ML}	21.57 ^{a[11]}	25.75 ^{a[11]}	11.64 ^{a[11]}	12.57 ^{a[11]}	19.7 ^{a[8]}	21.56 ^{a[11]}	-
	log K _{ML} ^H	3.47	3.65	-	4.60	-	-	15.81 ^[12]
	log K _{MLH} ^H	2.07	1.69	-	-	-	-	-
DOTA	log K _{ML}	20.21 ^{a[11]}	24.83 ^{a[11]}	11.49 ^{a[11]}	16.11 ^{a[11]}	23.4 ^{b[13,14]}	24.7 ^{b[6]}	25.0 ^{b[13,14]}
	log K _{ML}	20.25 ^{a[16]}	23.20 ^{a[16]}	10.44 ^{a[16]}	14.82 ^{a[16]}	-	23.31 ^{c[8]}	19.2 ^[15]
DO3A-pic	log K _{ML} ^H	4.42	4.17	6.89	4.59	-	2.65	-
	log K _{MLH} ^H	3.06	3.31	6.37	4.32	-	-	20.96 ^e
	log K _{MLH2} ^H	1.98	1.97	-	-	-	-	-
	log K _{MLH2} ^H	1.98	1.97	-	-	-	-	-

Résultats obtenus à 25°C et I=0.15M NaCl. La déviation standard est représentée entre parenthèse.
 a: I=0.1M KCl, b: I= 0.1 M NaCl, c: I= 0.15 M NaCl, d : constantes de stabilité obtenues en utilisant la combinaison des données de pH-potentiométrie et de spectrophotométrie UV-visible ; I = 0.15 M NaCl, e: Valeurs de pGd, calculées pour c_{Gd3+}=1μM, c_L=10μM, pH=7.4

Chapitre 3

Comme attendu, avec les ions métalliques M^{2+} , **DO3A-Py-Cbz(6)** et **DO3A-Py-NH₂(6)** forment des complexes de stabilité très similaires (en particulier pour les ions métalliques de petites tailles). En effet, dans les complexes $[M(\text{DO3A-Py-Cbz(6)})]$, le carbamate n'est probablement pas coordonné au métal puisque le nombre de coordination des ions métalliques M^{2+} est le plus souvent de 6. Ceci a été mis en évidence récemment par Takács et al. pour les complexes de Cu^{2+} formés avec le ligand DO3A-SA (DO3A-arylsulphonamide) [11] ou pour les complexes de DO3A-pic formés les ions métalliques Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} et Pb^{2+} [16].

Quant aux complexes de lanthanides, leur stabilité est supérieure avec **DO3A-Py-Cbz(6)** à celle des complexes correspondants $[\text{Ln}(\text{DO3A-Py-NH}_2(6))]$. En effet, les ions Ln^{3+} ont des nombres de coordination plus élevés et nécessitent des ligands octa- ou nona-dentés. **DO3A-Py-NH₂(6)** possède 8 sites de coordination tandis que **DO3A-Py-Cbz(6)** en possède 9 étant donné la coordination du carbamate du bras latéral (*cf.* résultats Chapitre 2), ce qui explique la stabilité accrue des dérivés carbamates.

Les complexes du ligand **DO3A-Py-Cbz(6)** sont globalement moins stables que ceux de DOTA, DO3A ou DO3A-pic. Ceci s'explique, d'une part, par la basicité globale du ligand **DO3A-Py-Cbz(6)** ($\Sigma \text{Log } K_{\text{Hi}} = 26.03$), qui est plus faible que celle des ligands comparés. D'autre part, certaines constantes de stabilité des complexes LnDO3A présentés ont été déterminées dans une force ionique KCl, ce qui fausse la comparaison. Le K^+ est connu pour former avec les ligands polydentates des complexes moins stable que le cation Na^+ . De ce fait, les constantes de stabilité déterminées en utilisant une force ionique de Na^+ sont en général plus faibles, car l'ion Na^+ présent à très haute concentration, rentre en compétition avec l'ion Ln^{3+} .

Les complexes de **DO3A-Py-NH₂(6)** possèdent tous une constante de protonation qui correspond à la protonation de la fonction amine sur la pyridine. Cette amine n'est pas coordonnée au métal comme cela a été montré dans le Chapitre 2. Comme attendu, la constante de protonation de cette fonction est diminuée dans les complexes par rapport au ligand ($\log K_{\text{H3}} = 7.71$), et cette diminution est évidemment plus importante pour les complexes avec un lanthanide trivalent, que pour ceux avec des métaux divalents. Sur les complexes $\text{LnDO3A-Py-NH}_2(6)$ à pH physiologique, l'amine est complètement déprotonée.

Etude de stabilité thermodynamique et d'inertie cinétique de complexes de Ln³⁺

Il est intéressant de noter que, dû à la présence de la pyridine, cette amine est plus acide ($\log K_{GdLH} = 3,92$) que l'amine exocyclique dans le complexe Gd(DOTA-NH₂) ($\log K_{GdLH} = 5,12$), malgré le fait que cette dernière se trouve en position α sur le bras acétate du DOTA donc plus proche du cation lanthanide [17]. Pour s'affranchir du problème des basicités différentes, la comparaison de la stabilité des complexes de Gd³⁺ peut être envisagée en calculant et comparant les valeurs de pGd des complexes formés. Les valeurs de pGd (qui caractérisent la concentration en ion Gd³⁺ libre : $pGd = -\log[Gd^{3+}]$) reflètent l'influence de la basicité du ligand et de la protonation du complexe sur la stabilité, plus cette valeur est élevée, plus le complexe est stable dans les conditions données (les pGd ont été calculés selon les conditions décrites par Raymond *et al.* [18]). Les valeurs de pGd reportées dans le **tableau 3.2** montrent de manière non ambiguë la supériorité en terme de stabilité du complexe [Gd(DO3A-Py-Cbz(6))] par rapport au complexe [Gd(DO3A-Py-NH₂(6))], conséquence du nombre plus élevé de groupements donneur avec la participation du carbamate. En comparant [Gd(DO3A-Py-Cbz(6))] et [GdDO3A-pic], qui sont tous les deux nona-coordinés, on constate que la coordination plus forte du carboxylate, avec sa charge négative, conduit à une stabilité plus élevée que celle du carbamate, sans charge. Néanmoins, tous les deux complexes Gd(DO3A-Py-Cbz(6)) et [Gd(DO3A-Py-NH₂(6))] possèdent une stabilité thermodynamique élevée qui peut permettre leur utilisation *in-vivo*.

3.3. Propriétés cinétiques

Pour une utilisation comme agents de contraste *in-vivo*, les complexes de lanthanide doivent témoigner d'une haute inertie cinétique afin d'éviter la toxicité liée à la libération d'ion Ln³⁺ libre en milieux biologiques. Due à la structure rigide et pré-organisée des macrocycles, les vitesses de dissociation catalysées en milieu acide des complexes de lanthanides formés à partir de ligands de type DOTA sont en général extrêmement lentes [3]. La structure pré-organisée de la cage de coordination, qui comprend les azotes macrocycliques et les oxygènes des bras carboxylates, rend la sphère de coordination des ions Ln³⁺ inaccessible à d'autres ligands compétiteurs. De plus, les structures compactes obtenues par la coordination des bras acétates au centre métallique, ne permettent pas la coordination avec d'autres métaux endogènes compétiteurs, tels que le Cu²⁺ ou le Zn²⁺ [3], ainsi, ces ions métalliques n'ont pas d'impacts sur la constante de vitesse de dissociation (l'intermédiaire dinucléaire ne peut pas se former étant donné l'absence d'atomes donneurs disponibles) [11,19,20].

Chapitre 3

Par conséquent, la dissociation acido-catalysée constitue la voie de dissociation la plus importante menant à la libération d'ion métallique non complexés pour les complexes formés à partir des ligands de type DOTA [3]. Ainsi, les études de cinétiques de dissociation ont été réalisées à des concentrations élevées en HCl ($0.05 \text{ M HCl} < c < 1.20 \text{ M HCl}$) dans le but de déterminer la constante de dissociation catalysée en milieu acide. Pour étudier la dissociation assistée par les protons, nous avons utilisé les conditions expérimentales où la dissociation suit une cinétique de pseudo-premier ordre ($[\text{H}^+] \gg [\text{Ln}(\text{L})]$) et la vitesse de dissociation est directement proportionnelle à la concentration totale en complexe (équation 3.4, où $[\text{LnL}]_t$ représente la concentration totale en complexe de lanthanide et k_{obs} est la constante de vitesse de dissociation de pseudo-premier ordre) :

$$-\frac{d[\text{LnL}]_t}{dt} = k_{obs}[\text{LnL}]_t \quad (3.4)$$

La concentration totale en complexe peut être représentée comme la somme des concentrations des complexes à l'équilibre sous leurs différentes formes protonées ($[\text{LnH}_x\text{L}]$ avec $x= 1, 2, \dots$).

Les cinétiques de dissociation en milieu acide ont été suivies par spectrométrie UV-visible en mesurant la diminution de l'absorbance des complexes à 350nm, les concentrations en complexe utilisés étaient de 0.247 mM ($[\text{Gd}(\text{DO3A-Py-NH}_2(\mathbf{6}))]$), 0.250 mM ($[\text{Yb}(\text{DO3A-Py-NH}_2(\mathbf{6}))]$), et 0.233 mM ($[\text{Ce}(\text{DO3A-Py-NH}_2(\mathbf{6}))]$). La cinétique de dissociation en milieu acide du complexe $[\text{Gd}(\text{DO3A-Py-Cbz}(\mathbf{6}))]$ a été suivie par relaxométrie pour une solution de complexe à 1mM.

Les cinétiques de dissociation en présence de Cu^{2+} ont été suivies par spectrométrie UV-visible pour le complexe $[\text{Ce}(\text{DO3A-Py-NH}_2(\mathbf{6}))]$ (0.15 mM) et par relaxométrie pour le complexe $[\text{Gd}(\text{DO3A-Py-NH}_2(\mathbf{6}))]$ (1 mM).

3.3.1. Cinétique de dissociation en milieu acide

Afin d'étudier la cinétique de dissociation en milieu acide des complexes de lanthanides [Ln(DO3A-Py-Cbz(6))] et [Ln(DO3A-Py-NH₂(6))], la dépendance de k_{obs} de la concentration [H]⁺ a été étudiée à c_{HCl} : 0.05 M - 0.30 M pour [Ln(DO3A-Py-NH₂(6))] et c_{HCl} : 0.01 M - 1.20 M HCl pour [Gd(DO3A-Py-Cbz(6))] (figures 3.6 et 3.7). Sous de telles conditions, les complexes sont thermodynamiquement instables et se dissocient complètement.

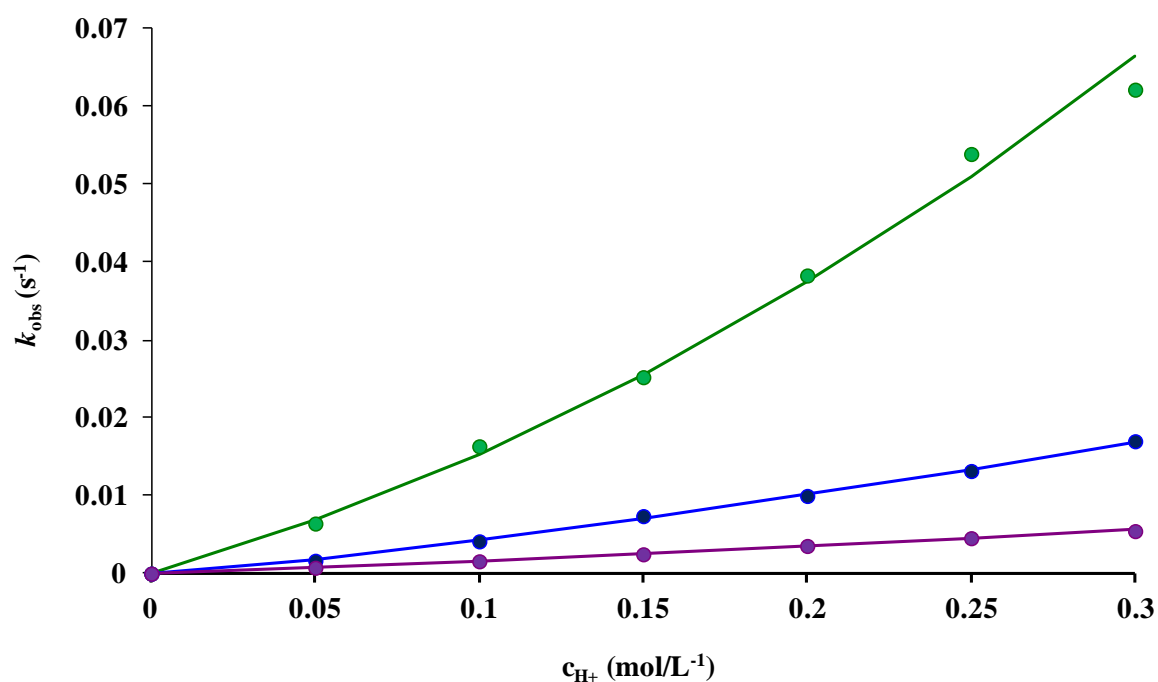


Figure 3.6 : Dépendance de la constante de pseudo- premier ordre k_{obs} en fonction de la concentration en ions H⁺ pour les complexes [Ce(DO3A-Py-NH₂(6))] (●) (0.225 mM), [Gd(DO3A-Py-NH₂(6))] (●) (0.247 mM) et [Yb(DO3A-Py-NH₂(6))] (●) (0.251 mM).

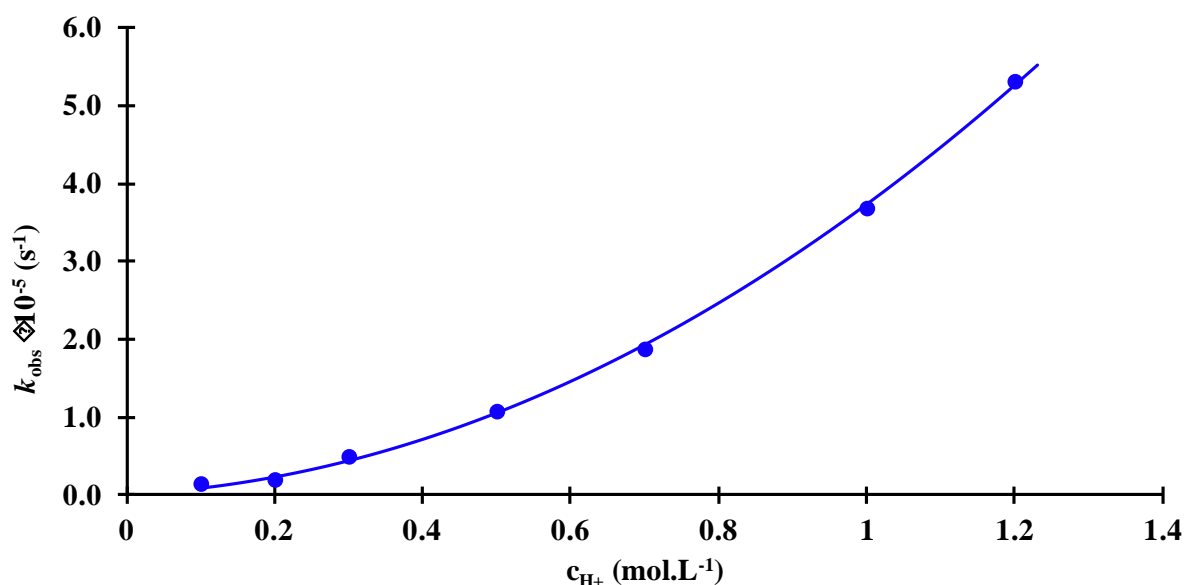


Figure 3.7 : Dépendance de la constante de pseudo- premier ordre k_{obs} en fonction de la concentration en ions H^+ pour le complexe $[Gd(DO3A-Py-Cbz(6))]$.

Sur chacune des courbes présentées (**figures 3.6 et 3.7**), k_{obs} montre une dépendance de second ordre à la concentration en protons. Ce comportement en milieux acide a déjà été observé pour des ligands macrocycliques (par exemple $[Ce(DOTA)]$) [21], mais est plus souvent reporté pour des complexes de ligands acycliques tels que le DTPA par exemple [8]. Cette dépendance quadratique indique que la dissociation des complexes peut se produire par des mécanismes spontanés (caractérisés par k_0) et proton-catalysé, ce dernier, via la formation de complexes mono- et diprotonés (caractérisés par k_1 et k_2 , respectivement). Ainsi, les constantes de vitesses de pseudo-premier ordre ont été analysées selon l'équation 3.5.

$$k_{obs} = k_0 + k_1[H^+] + k_2[H^+]^2 \quad (3.5)$$

Tableau 3.3 : Constantes de vitesse caractérisant la dissociation des complexes de Ln^{3+} (25°C)

	k_0 (s ⁻¹)	k_1 (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_2 (M ⁻² s ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h) ^c
$[Ce(DO3A-Py-NH_2(6))]$	fixé à 0	$(1.18 \pm 0.09 \times 10^{-1})$	$(3.4 \pm 0.5 \times 10^{-1})$	4.1×10^4
$[Gd(DO3A-Py-NH_2(6))]$	fixé à 0	$(4.5 \pm 0.2 \times 10^{-2})$	$(4.6 \pm 0.7 \times 10^{-2})$	1.1×10^5
$[Yb(DO3A-Py-NH_2(6))]$	fixé à 0	$(1.46 \pm 0.03 \times 10^{-2})$	$(1.4 \pm 0.2 \times 10^{-2})$	3.3×10^5
$[Gd(DO3A-Py-Cbz(6))]$	fixé à 0	$(6.38 \pm 0.01 \times 10^{-6})$	$(2.99 \pm 0.3 \times 10^{-5})$	7.6×10^8
$[Gd(DO3A)]^a$	0	(2.3×10^{-2})	-	2.1×10^5
$[Gd(DOTA)]^b$	6.7×10^{-11}	(1.8×10^{-6})	-	2.8×10^6

a: 0.1 M KCl, 25°C réf. [11], b : 0.15M NaCl, 25°C réf. [22], c: calculé à pH 7.4 tel que $t_{1/2} = \ln 2 / k_{obs}$

L'ajustement des données k_{obs} vs. c_{H^+} à l'équation 3.5 a donné des valeurs de k_0 faibles et la plupart du temps négatives avec une erreur élevée non acceptable. Ceci indique que la dissociation spontanée ne contribue pas à la réaction de dissociation dans ces conditions, les valeurs de k_0 ont donc été fixées à 0 lors de l'ajustement des données. Les résultats des calculs sont résumés dans le **tableau 3.3**.

La comparaison des constantes de vitesse de dissociation catalysées en milieu acide (k_1) listées dans le **tableau 3.3**, nous permet de conclure que la présence de la fonction facilement protonable sur le ligand **DO3A-Py-NH₂(6)**, affecte de manière négative la vitesse de dissociation des complexes correspondants. Le ligand octadenté **DO3A-Py-NH₂(6)**, forme avec les ions Ln³⁺ des complexes d'inertie similaire à celle des complexes du DO3A heptadenté. Ceci est certainement dû à la présence d'une fonction protonable (l'amine), sur la molécule qui contribue à l'accélération de la dissociation proton-assistée. La protonation du complexe sur l'amine, peut même conduire à la décoordination de la fonction 6-amino-2-méthylpyridine du complexe, résultant à une coordination de l'ion métallique Ln³⁺ de même type que dans le cas des complexes formés avec le DO3A. Lorsque qu'il n'existe plus de fonction facilement protonable dans le complexe, l'inertie cinétique des complexes est plus élevée. Dans le complexe **[Gd(DO3A-Py-Cbz(6))]**, neuf atomes donneurs coordinent l'ion métallique et le bras latéral n'est plus facilement protonable. D'un point de vue mécanique, lorsqu'un complexe est protoné, le proton est transféré aux atomes d'azote du macrocycle (lors d'une étape lente et déterminante), au même moment, l'ion métallique quitte la cage de coordination du ligand dû aux répulsions électrostatiques existantes entre les atomes d'azote positivement chargés, et le cation Ln³⁺. Lors de ce mécanisme, le transfert de proton a lieu plus lentement dans le cas du complexe **[Gd(DO3A-Py-Cbz(6))]**, étant donné que la protonation de ce complexe ne peut avoir lieu que sur un des bras acétate coordiné, comme cela a été mis en évidence pour les complexes [Ln(DOTA)]⁻ [6,19]. En résumé, la saturation de la sphère de coordination du Gd³⁺ avec les atomes donneurs du ligand, et l'élimination de la fonction facilement protonable conduit à une inertie cinétique pour le **[Gd(DO3A-Py-Cbz(6))]**, qui devient comparable à celle de [Gd(DOTA)]⁻. Les résultats obtenus pour les complexes formés avec les ions Ce³⁺, Gd³⁺ et Yb³⁺ montrent que la diminution de la taille du lanthanide entraîne la diminution de la vitesse de dissociation catalysée en milieu acide.

Chapitre 3

Ceci est une tendance généralement observée pour un grand nombre de complexes de type aminopolycarboxylates. Cette observation peut s'expliquer en termes de meilleure correspondance entre la taille de la cavité chélatante du ligand et celle de l'ion métallique Ln^{3+} .

Etant donné les différences entre les mécanismes de dissociation et pour des raisons pratiques, l'inertie cinétique des complexes est souvent comparée en calculant le temps de demi-vie de dissociation ($t_{1/2}$). Les valeurs de $t_{1/2}$ obtenues pour $\text{pH}=7,4$ sont comparées dans le **tableau 3.3**. Les temps de demi-vies des complexes $[\text{Gd}(\text{DO3A-Py-NH}_2(\mathbf{6}))]$ et $[\text{Gd}(\text{DO3A-Py-Cbz}(\mathbf{6}))]$, sont similaires ($[\text{Gd}(\text{DO3A-Py-NH}_2(\mathbf{6}))]$ vs. $[\text{Gd}(\text{DO3A})]$), ou légèrement inférieurs ($[\text{Gd}(\text{DO3A-Py-Cbz}(\mathbf{6}))]$ vs. $[\text{Gd}(\text{DOTA})]^-$), à ceux décrits et publiés pour les complexes macrocycliques $[\text{Gd}(\text{DO3A})]$ et $[\text{Gd}(\text{DOTA})]^-$ respectivement. Néanmoins, il faut prendre les comparaisons avec précaution, car les constantes de vitesse de dissociation n'ont pas été obtenues dans les mêmes conditions de pH.

Aussi, pour ces complexes macrocycliques, il est souvent très difficile de déterminer la valeur de k_0 qui est calculée à partir des données expérimentales avec beaucoup d'incertitude, et de très grandes erreurs. Quand on calcule le $t_{1/2}$ à pH 7,4, pour le $[\text{Gd}(\text{DOTA})]^-$, c'est la dissociation spontanée qui contribue le plus à la dissociation, alors que ce processus n'a pas pu être caractérisé dans notre étude (car trop loin du pH physiologique). Dans un tel cas, il vaut mieux rester sur la comparaison des constantes de vitesse, qui montre que les valeurs de k_1 sont similaires pour le complexe $[\text{Gd}(\text{DO3A-Py-Cbz}(\mathbf{6}))]$ et pour $[\text{Gd}(\text{DOTA})]^-$. Malgré ces incertitudes dans la description exacte de la cinétique de dissociation, et plus particulièrement dans l'extrapolation des données aux conditions physiologiques, on peut conclure que l'utilisation *in-vivo* des complexes de lanthanides formés à partir des ligands **DO3A-Py-NH₂(6)** et **DO3A-Py-Cbz(6)** reste envisageable étant donné que les constantes de vitesses de dissociation catalysée en milieu acide sont plus favorables que celles du complexe $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$, qui est l'agent de contraste IRM le plus utilisé.

3.3.2. Cinétique de dissociation assistée par les ions Cu²⁺ des complexes [Ce(DO3A-Py-NH₂)(6)] et [Gd(DO3A-Py-NH₂)(6)]

Afin de vérifier que la cinétique de dissociation de ces complexes n'est pas influencée par la présence de cations endogènes compétiteurs, et de nous approcher plus à des conditions physiologiques, nous avons étudié la cinétique de dissociation Cu-assistée par spectrophotométrie UV-visible du complexe [Ce(DO3A-Py-NH₂)(6)], en présence de 30 excès de Cu²⁺, pour des pH compris entre 3.45 et 4.73. Une étude similaire a été menée pour le complexe [Gd(DO3A-Py-NH₂)(6)], dont la cinétique de dissociation a été suivie par relaxivité en présence de 10 excès de Cu²⁺, pour des pH compris entre 3.10 et 4.20. Il est nécessaire de travailler à des pH légèrement acides, étant donné la lente dissociation des complexes macrocycliques. L'excès de cuivre est nécessaire pour suivre la dissociation à ces pH, car il permet de complexer immédiatement tout ligand libéré par la dissociation du complexe de Gd³⁺, et empêche donc la reformation du complexe GdL. Il faut noter que dans ces conditions la dissociation reste très lente et ces études ont nécessité le suivi des réactions pendant plusieurs mois. Les données obtenues ont été ajustées à l'équation 3.5 simultanément avec les données de cinétique acido-catalysée présentées plus haut (les résultats ont été représentés en échelle log-log pour une meilleure représentation de la tendance générale de la courbe (figure 3.8)).

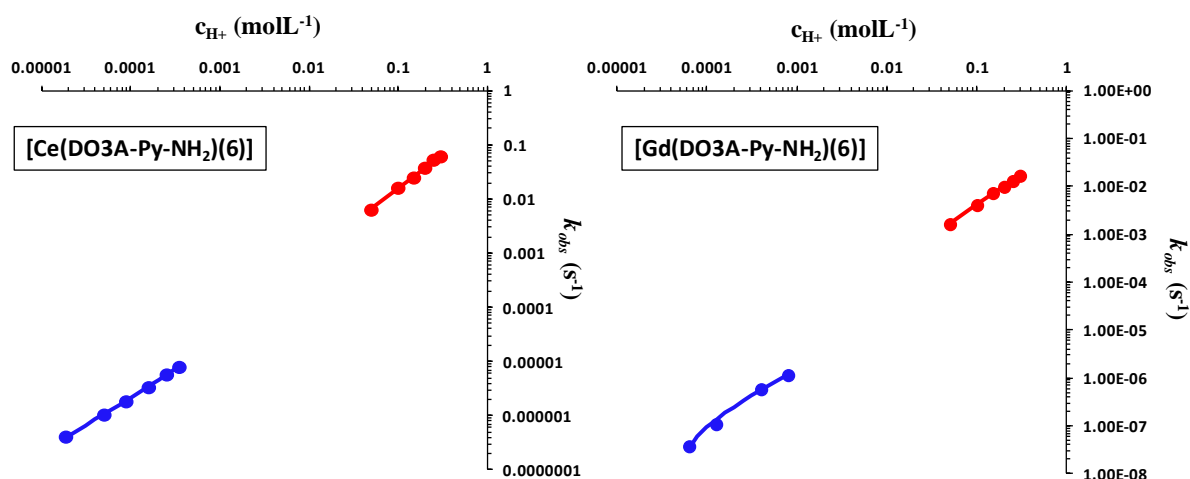


Figure 3.8 : Tracé en échelle log-log de la dépendance de k_{obs} en fonction de la concentration en ions H⁺ sans Cu²⁺ (rouge) et en présence d'excès de Cu²⁺ (bleu) pour les complexes [Ce(DO3A-Py-NH₂)(6)] ($\times 30$ Cu²⁺) et [Gd(DO3A-Py-NH₂)(6)] ($\times 10$ Cu²⁺) pour pH > 3.10. Le trait représente les valeurs ajustées.

Chapitre 3

Tableau 3.4 : Constantes de vitesse caractérisant la dissociation des complexes de Ln^{3+} (25°C)

	k_0 (s^{-1})	k_1 ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_2 ($\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$)	$t_{1/2}$ (h) ^a
[Ce(DO3A-Py-NH ₂ (6))]	fixé à 0	(2.12±0.04×10 ⁻²)	(4.4±0.6)	2.2 × 10 ⁵
[Gd(DO3A-Py-NH ₂ (6))]	fixé à 0	(6.0±0.7×10 ⁻⁴)	(1.4±0.2)	8.1 × 10 ⁶

Constantes de vitesse obtenues par ajustement simultané des données de cinétique de dissociation acido-catalysée avec les constantes de vitesses obtenues en présence 30 excès de Cu^{2+} .

a: calculé à pH 7.4 tel que $t_{1/2} = \ln 2 / k_{obs}$

Les valeurs des constantes de vitesses caractérisant la dissociation des complexes de Ln^{3+} (25°C), obtenues par l'ajustement simultané des données de cinétique de dissociation catalysé en milieu acide avec les constantes de vitesses de dissociation obtenues en présence d'excès de Cu^{2+} , sont présentées dans le **tableau 3.4**. Les valeurs de k_1 calculées par ajustement de toutes les données de cinétique sont inférieures d'environ 1 et 2 ordre de grandeur pour [Ce(DO3A-Py-NH₂(6))] et [Gd(DO3A-Py-NH₂(6))] respectivement, par rapport aux constantes obtenues dans le paragraphe précédent. Etant donné la diminution des valeurs de constantes de dissociation, les temps de demi-réaction sont supérieurs d'un ordre de grandeur pour chacun des deux complexes étudiés, indiquant une cinétique de dissociation de ces complexes d'autant plus lente dans les conditions de pH physiologique. Ces données montrent clairement que les vitesses de dissociations ne sont pas catalysées par la présence d'ion endogène Cu^{2+} , et confirment alors que la voie de dissociation principale des complexes dérivés du DOTA est la voie de dissociation catalysée en milieu acide, en accord avec les données de la littérature [11]. Il faut noter que malgré une gamme de pH plus proche des conditions physiologiques, la valeur du k_0 n'a pas pu être obtenue, car les erreurs (correspondant à une déviation standard) étaient toujours plus élevées que la valeur du k_0 elle-même.

3.4. Conclusion

Nous avons reporté l'étude de stabilité thermodynamique et d'inertie cinétique de complexes formés avec certains lanthanides et cations métalliques endogènes et les ligands **H₃DO3A-Py-Cbz(6)** et **H₃DO3A-Py-NH₂(6)**. Les complexes de Ln³⁺ formés avec ces ligands ont précédemment montré leur intérêt comme agents de contraste multimodaux (imagerie optique et IRM). Des études de stabilité thermodynamique, ont montré que la présence d'une fonction carbamate coordinante sur le complexe [**Ln(DO3A-Py-Cbz(6))**], entraîne une augmentation de la stabilité des complexes par rapport à son analogue amine [**Ln(DO3A-Py-NH₂(6))**]. Cependant la présence de la fonction 2-méthyl-6-pyridinyl entraîne une diminution de la basicité des azotes macrocycliques et une diminution des constantes de stabilité de [**Ln(DO3A-Py-Cbz(6))**] et [**Ln(DO3A-Py-NH₂(6))**], comparées à celles reportées pour les complexes [**Ln(DOTA)**]⁻ ou [**Ln(DO3A)**]. Des études de cinétique de dissociation des complexes [**Ln(DO3A-Py-NH₂(6))**] ont confirmé la tendance observée pour les complexes de [**Ln(DO3A)**] formés avec des ions Ln³⁺ de différentes tailles. Nos résultats indiquent que la dissociation des complexes [**Gd(DO3A-Py-NH₂(6))**] et [**Ce(DO3A-Py-NH₂(6))**] a principalement lieu via une voie de dissociation catalysée par des protons, en accord avec les données de la littérature reportées pour des complexes de Ln³⁺, formés avec des ligands de type DOTA. La voie de dissociation assistée par des cations endogènes comme le Cu²⁺ ne contribue pas à la dissociation. Malgré les efforts pour s'approcher des conditions physiologiques, nous n'avons pas pu caractériser la voie de dissociation spontanée, comme c'est très souvent le cas pour les complexes macrocycliques. Les temps de demi-vie de dissociation, estimés dans des conditions proches du pH physiologique, sont de l'ordre de 10⁵ heures ([**Ce(DO3A-Py-NH₂(6))**]) à 10⁶ heures ([**Gd(DO3A-Py-NH₂(6))**]), indiquant que ces complexes sont suffisamment inertes pour une application *in-vivo*.

3.5. Références

- (1) Weinreb, J. C.; Abu-Alfa, A. K.: Gadolinium-based contrast agents and nephrogenic systemic fibrosis: Why did it happen and what have we learned? *Journal of Magnetic Resonance Imaging* **2009**, *30*, 1236-1239.
- (2) Aime, S.; Caravan, P.: Biodistribution of gadolinium-based contrast agents, including gadolinium deposition. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* **2009**, *30*, 1259-1267.
- (3) Brücher, E.; Tircso, G.; Baranyai, Z.; Kovacs, Z.; Sherry, A. D.: Stability and Toxicity of Contrast Agents. In *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*; John Wiley & Sons, Ltd, **2013**; pp 157.
- (4) Brücher, E.: Kinetic Stabilities of Gadolinium(III) Chelates Used as MRI Contrast Agents. In *Contrast Agents I: Magnetic Resonance Imaging*; Krause, W., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2002; pp 103-122.
- (5) He, J.; Bonnet, C. S.; Eliseeva, S. V.; Lacerda, S.; Chauvin, T.; Retailleau, P.; Szeremeta, F.; Badet, B.; Petoud, S.; Tóth, É.; Durand, P.: Prototypes of Lanthanide(III) Agents Responsive to Enzymatic Activities in Three Complementary Imaging Modalities: Visible/Near-Infrared Luminescence, PARACEST-, and T1-MRI. *Journal of the American Chemical Society* **2016**.
- (6) Kumar, K.; Chang, C. A.; Francesconi, L. C.; Dischino, D. D.; Malley, M. F.; Gougoutas, J. Z.; Tweedle, M. F.: Synthesis, Stability, and Structure of Gadolinium(III) and Yttrium(III) Macrocyclic Poly(amino carboxylates). *Inorganic chemistry* **1994**, *33*, 3567-3575.
- (7) Rodriguez-Rodriguez, A.; Garda, Z.; Ruscsak, E.; Esteban-Gomez, D.; de Blas, A.; Rodriguez-Blas, T.; Lima, L. M. P.; Beyler, M.; Tripier, R.; Tircso, G.; Platas-Iglesias, C.: Stable Mn²⁺, Cu²⁺ and Ln³⁺ complexes with cyclen-based ligands functionalized with picolinate pendant arms. *Dalton Transactions* **2015**, *44*, 5017-5031.
- (8) Regueiro-Figueroa, M.; Bensenane, B.; Ruscsak, E.; Esteban-Gomez, D.; Charbonniere, L. J.; Tircso, G.; Toth, I.; de Blas, A.; Rodriguez-Blas, T.; Platas-Iglesias, C.: Lanthanide dota-like complexes containing a picolinate pendant: structural entry for the design of Ln(III)-based luminescent probes. *Inorganic chemistry* **2011**, *50*, 4125-41.
- (9) Chatterton, N.; Gateau, C.; Mazzanti, M.; Pecaut, J.; Borel, A.; Helm, L.; Merbach, A.: The effect of pyridinecarboxylate chelating groups on the stability and electronic relaxation of gadolinium complexes. *Dalton Transactions* **2005**, 1129-1135.
- (10) Burai, L.; Fabian, I.; Kiraly, R.; Szilagyi, E.; Brucher, E.: Equilibrium and kinetic studies on the formation of the lanthanide(III) complexes, [Ce(dota)]- and [Yb(dota)]-(H₄dota[space]=[space]1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid). *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1998**, 243-248.
- (11) Takács, A.; Napolitano, R.; Purgel, M.; Bényei, A. C.; Zékány, L.; Brücher, E.; Tóth, I.; Baranyai, Z.; Aime, S.: Solution Structures, Stabilities, Kinetics, and Dynamics of DO3A and DO3A–Sulphonamide Complexes. *Inorganic chemistry* **2014**, *53*, 2858-2872.
- (12) Tircsó, G.; Regueiro-Figueroa, M.; Nagy, V.; Garda, Z.; Garai, T.; Kálmán, F. K.; Esteban-Gómez, D.; Tóth, É.; Platas-Iglesias, C.: Approaching the Kinetic Inertness of Macrocyclic Gadolinium(III)-Based MRI Contrast Agents with Highly Rigid Open-Chain Derivatives. *Chemistry – A European Journal* **2016**, *22*, 896-901.
- (13) Cacheris, W. P.; Nickle, S. K.; Sherry, A. D.: Thermodynamic study of lanthanide complexes of 1,4,7-triazacyclononane-N,N',N''-triacetic acid and 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid. *Inorganic chemistry* **1987**, *26*, 958-960.
- (14) Szilágyi, E.; Tóth, É.; Kovács, Z.; Platzeck, J.; Radüchel, B.; Brücher, E.: Equilibria and formation kinetics of some cyclen derivative complexes of lanthanides. *Inorganica Chimica Acta* **2000**, *298*, 226-234.
- (15) Ruloff, R.; Toth, E.; Scopelliti, R.; Tripier, R.; Handel, H.; Merbach, A. E.: Accelerating water exchange for Gd(III) chelates by steric compression around the water binding site. *Chemical communications* **2002**, 2630-2631.

- (16) Regueiro-Figueroa, M.; Ruscsák, E.; Fra, L.; Tircsó, G.; Tóth, I.; de Blas, A.; Rodríguez-Blas, T.; Platas-Iglesias, C.; Esteban-Gómez, D.: Highly Stable Complexes of Divalent Metal Ions (Mg²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, and Pb²⁺) with a DOTA-Like Ligand Containing a Picolinate Pendant. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2014**, 2014, 6165-6173.
- (17) Chauvin, T.; Durand, P.; Bernier, M.; Meudal, H.; Doan, B.-T.; Noury, F.; Badet, B.; Beloeil, J.-C.; Tóth, É.: Detection of Enzymatic Activity by PARACEST MRI: A General Approach to Target a Large Variety of Enzymes. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, 47, 4370-4372.
- (18) Xu, J.; Franklin, S. J.; Whisenhunt, D. W.; Raymond, K. N.: Gadolinium complex of tris[(3-hydroxy-1-methyl-2-oxo-1,2-didehydropyridine-4-carboxamido)ethyl]-amine: A New Class of gadolinium magnetic resonance relaxation agents. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, 117, 7245-7246.
- (19) Toth, E.; Brucher, E.; Lazar, I.; Toth, I.: Kinetics of Formation and Dissociation of Lanthanide(III)-DOTA Complexes. *Inorganic chemistry* **1994**, 33, 4070-4076.
- (20) Tóth, É.; Király, R.; Platzek, J.; Radüchel, B.; Brücher, E.: Equilibrium and kinetic studies on complexes of 10-[2,3-dihydroxy-(1-hydroxymethyl)-propyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetate. *Inorganica Chimica Acta* **1996**, 249, 191-199.
- (21) Brücher, E.; Laurenczy, G.; Makra, Z. S.: Studies on the kinetics of formation and dissociation of the cerium(III)-DOTA complex. *Inorganica Chimica Acta* **1987**, 139, 141-142.
- (22) Baranyai, Z.; Pálinkás, Z.; Uggeri, F.; Maiocchi, A.; Aime, S.; Brücher, E.: Dissociation Kinetics of Open-Chain and Macrocyclic Gadolinium(III)-Aminopolycarboxylate Complexes Related to Magnetic Resonance Imaging: Catalytic Effect of Endogenous Ligands. *Chemistry – A European Journal* **2012**, 18, 16426-16435.

Chapitre 4

Etude de l'influence du lanthanide et de la nature du proton échangeable sur l'effet CEST

Table des matières

4.1. Introduction.....	127
4.2. Détermination du nombre d'hydratation du complexe.....	128
4.3. Influence du lanthanide et de la nature du proton échangeable sur l'effet CEST.....	130
4.3.1. Influence du lanthanide sur l'effet CEST.....	131
4.3.2. Influence de la nature du proton échangeable sur l'effet CEST : comparaison entre un proton amide et carbamate.....	137
4.4. Influence du pH et constantes de vitesse d'échange.....	139
4.4.1. Détermination de la présence d'isomères en solution.....	140
4.4.2. Influence du pH sur l'effet CE.....	142
4.4.3. Détermination des constantes de vitesse d'échange k_{ex}	146
4.5. Conclusion.....	152
4.6. Références.....	153

4.1. Introduction

Aujourd'hui encore, la capacité d'un agent de contraste à produire ou non un effet CEST reste difficile à prévoir. Tout de même, certains paramètres sont connus pour avoir une influence sur l'effet paraCEST, comme entre autres, la nature du lanthanide complexé [1,2], la géométrie de coordination du complexe (SAP/TSAP) [3,4] ou encore la nature du proton échangeable (provenant d'un groupement fonctionnel du ligand ou de la molécule d'eau coordonnée au lanthanide) [2]. Différentes stratégies sont adoptées pour améliorer la sensibilité des agents paraCEST comme par exemple l'augmentation du nombre de protons échangeables sur la structure moléculaire de l'agent de contraste ou l'augmentation du déplacement chimique $\Delta\omega$ de ces protons par utilisation du lanthanide approprié [5]. Cependant, la conception rationnelle d'un agent de contraste présentant un effet CEST optimal reste encore un challenge.

Ce chapitre reporte l'étude des complexes de Ln^{3+} avec le ligand **DO3A-Py-Am(6)** qui est constitué d'une partie chélatante de type DO3A, *N*-fonctionnalisée par un bras 2-méthylpyridine possédant une fonction phénylacétamide (substrat de la pénicilline amidase) en position 6 de la pyridine. Nos travaux précédents (Chapitre 2 et [6]) ont montré que la fonction carbamate dans les complexes de Ln^{3+} peut générer un effet CEST grâce à un échange de proton de l'ordre de quelques milliers de s^{-1} . Dans ce travail, notre objectif était d'étudier l'effet CEST d'une fonction amide placée dans la même position 6 de la pyridine que les carbamates précédemment décrits [6]. Les complexes du ligand **DO3A-Py-Am(6)** ne représentent pas d'intérêt particulier direct pour l'imagerie biologique, ils ont été étudiés dans la volonté de permettre une meilleure compréhension des paramètres déterminants de l'effet CEST. Nous nous sommes ici intéressés à la comparaison des effets CEST obtenus pour les complexes formés avec différents ions lanthanides(III) (**figure 4.1**). Nous avons également comparé ces résultats à ceux obtenus dans l'étude précédente pour **DO3A-Py-Cbz(6)** (analogue carbamate de **DO3A-Py-Am(6)**) (données non publiées).

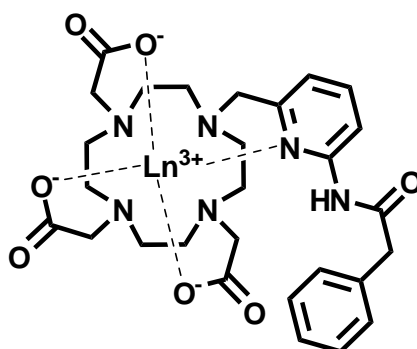


Figure 4.1 : Structure des complexes formés avec le ligand **DO3A-Py-Am(6)** ($\text{Ln}^{3+} = \text{Pr}^{3+}, \text{Nd}^{3+}, \text{Eu}^{3+}, \text{Gd}^{3+}, \text{Tb}^{3+}, \text{Dy}^{3+}, \text{Ho}^{3+}, \text{Er}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ et Yb^{3+}).

Tous les complexes étudiés dans ce chapitre ont été synthétisés à l'Institut de Chimie des Substances Naturelle (CNRS, Gif-sur-Yvette) par l'équipe du Dr Philippe Durand.

4.2. Détermination du nombre d'hydratation du complexe

Comme nous l'avons décrit dans le Chapitre 2, pour un lanthanide donné, plus le proton labile est proche du centre métallique, plus le déplacement paramagnétique de ce proton est important. Dans le cas des complexes **Ln(DO3A-Py-Am(6))**, la proximité du NH du bras avec le lanthanide sera assurée par la coordination de l'amide à l'ion métallique. Cette coordination conduit à la saturation de la sphère de coordination du métal et à la formation des complexes non-hydratés. Afin de vérifier cette coordination, des études de relaxivité du complexe **Gd(DO3A-Py-Am(6))** et des mesures de décroissance de luminescence des complexes **Eu(DO3A-Py-Am(6))** et **Tb(DO3A-Py-Am(6))** ont été menées.

Le profil NMRD de **Gd(DO3A-Py-Am(6))** montrant la dépendance de la relaxivité au champ magnétique a été mesuré à 25°C, 37°C et 50°C pour des champs magnétiques compris entre 0.01 et 80MHz (**figure 4.2**).

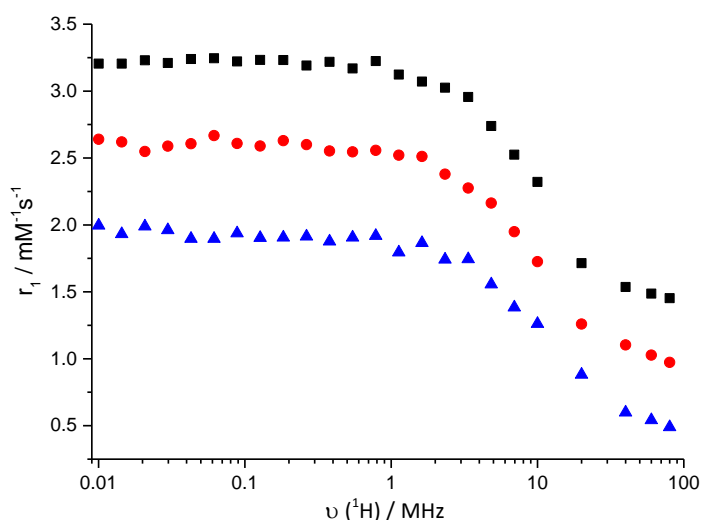


Figure 4.2 : Relaxivité du proton, r_1 , en fonction de la fréquence de Larmor à différentes températures, 25°C (■), 37°C (●) et 50°C (▲) pour **Gd(DO3A-Py-Am(6))**.

Le profil NMRD de **Gd(DO3A-Py-Am(6))** montre que la relaxivité, r_1 , diminue lorsque la température augmente quelle que soit la fréquence de Larmor appliquée (**Figure 4.2**). L'allure générale de ce profil NMRD et les valeurs absolues correspondent à ce qui est attendu pour des complexes de Gd^{3+} non-hydratés, pour lesquels seulement le mécanisme de la sphère externe est opérationnel. En effet, la relaxivité de **Gd(DO3A-Py-Am(6))** obtenue à 25°C et 20MHz est de $1.71\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Cette valeur, relativement faible, est en accord avec un nombre d'hydratation $q=0$ et est comparable avec la relaxivité de **Gd(DO3A-Py-Cbz(6))**, l'analogue carbamate de **Gd(DO3A-Py-Am(6))**, qui possède dans les mêmes conditions une relaxivité $r_1=1.74\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Des études de décroissance de luminescence des complexes d'**Eu(DO3A-Py-Am(6))** et de **Tb(DO3A-Py-Am(6))** ont été menées afin de vérifier le nombre d'hydratation de ces molécules.

La présence de la pyridine sur la structure moléculaire de **DO3A-Py-Am(6)** permet l'excitation du lanthanide (Eu ou Tb) par effet d'antenne à la longueur d'onde $\lambda_{\text{ex}}=258\text{nm}$. Les temps de vie de luminescence ainsi que les valeurs de q calculées sont reportées dans le **tableau 4.1**.

Tableau 4.1 : Temps de vie de luminescence et nombre de molécules d'eau coordonnées

	τ_{H_2O} (ms)	τ_{D_2O} (ms)	q
Eu(DO3A-Py-Am(6))	1.185	1.862	0.07 ^a
Tb(DO3A-Py-Am(6))	2.724	3.054	0.2 ^a

Résultats obtenus pour $\lambda_{ex}=258\text{nm}$, $\lambda_{em}=616\text{nm}$ pour Eu et $\lambda_{em}=545\text{nm}$ pour Tb, 25°C, pH/pD=7.4.
a : calculés à partir de référence [7]

Les valeurs de nombre d'hydratation obtenues pour ces complexes sont en accord avec les valeurs de relaxivité, qui impliquent la coordination de l'amide sur le centre métallique. Ainsi, tous les sites de coordination du lanthanide sont occupés par les fonctions électro-donneuses du ligand macrocyclique et inaccessibles aux molécules d'eau. Ces résultats rejoignent ceux observés pour les complexes du **DO3A-Py-Cbz(6)**, pour lequel le carbamate est également coordonné au lanthanide.

La coordination de l'amide sur le lanthanide favorise le rapprochement du proton labile au centre métallique, cette configuration est supposée conduire à des déplacements chimiques importants et ainsi promouvoir l'effet paraCEST du proton de l'amide coordonné.

4.3. Influence du lanthanide et de la nature du proton échangeable sur l'effet CEST

Les propriétés CEST de différents complexes de lanthanides formés avec **DO3A-Py-Am(6)** ont été étudiés.

Pour chacun des spectres représentés, le pic centré à 0 ppm représente la saturation directe des protons de l'eau du solvant. Les expériences CEST ont été réalisées sur une fenêtre de 300 ppm allant de -150 à 150 ppm par application de l'impulsion radio fréquence tous les ppm avec un délai de saturation de 3s et une puissance de 25 μ T (10mW).

Sur les complexes formés avec le ligand **DO3A-Py-Am(6)**, l'effet CEST est attendu de l'unique proton échangeable de la molécule, c'est-à-dire du proton NH de la fonction amide.

4.3.1. Influence du lanthanide sur l'effet CEST

Tous les complexes étudiés ont permis d'observer au moins un effet de transfert de saturation. En effet, certains de ces complexes présentent plusieurs effets CEST, témoignant de la présence en solution de différents isomères (SAP/TSAP).

Les complexes formés à partir du Praséodyme et du Néodyme (**Nd(DO3A-Py-Am(6))** et **Pr(DO3A-Py-Am(6))**), possédant chacun deux isomères, présentent les effets CEST de plus faible intensité ($\leq 1\%$) et ne permettent pas une étude approfondie (**figure 4.3**).

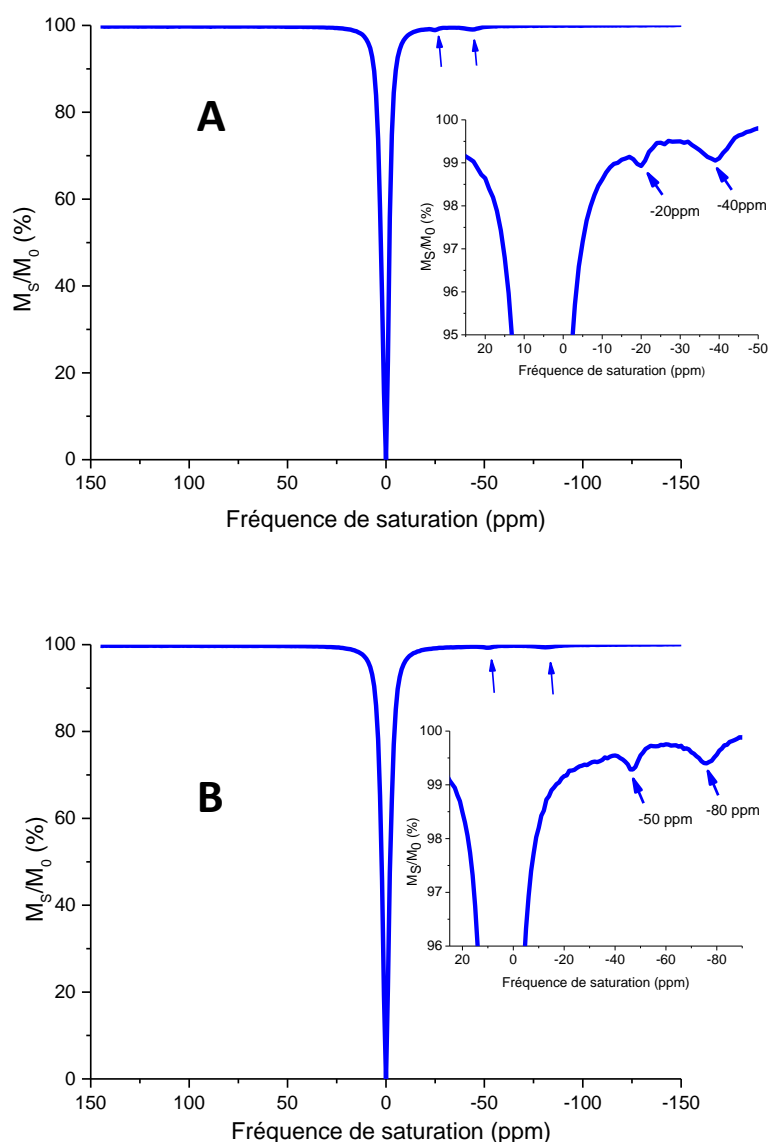


Figure 4.3 : Spectres CEST des complexes **Nd(DO3A-Py-Am(6))** (A) et **Pr(DO3A-Py-Am(6))** (B), 20mM, 295K, pH 7

Chapitre 4

La figure 4.4 montre la distribution des différents effets CEST obtenus en fonction des complexes de lanthanide étudiés.

Parmi les différents complexes étudiés, celui formé avec le dysprosium (**Dy(DO3A-Py-Am(6))**) possède l'effet CEST le plus déplacé vers les fréquences négatives, à l'inverse, le complexe formé avec le thulium (**Tm(DO3A-Py-Am(6))**) possède l'effet CEST le plus déplacé vers les fréquences positives (**figure 4.4**).

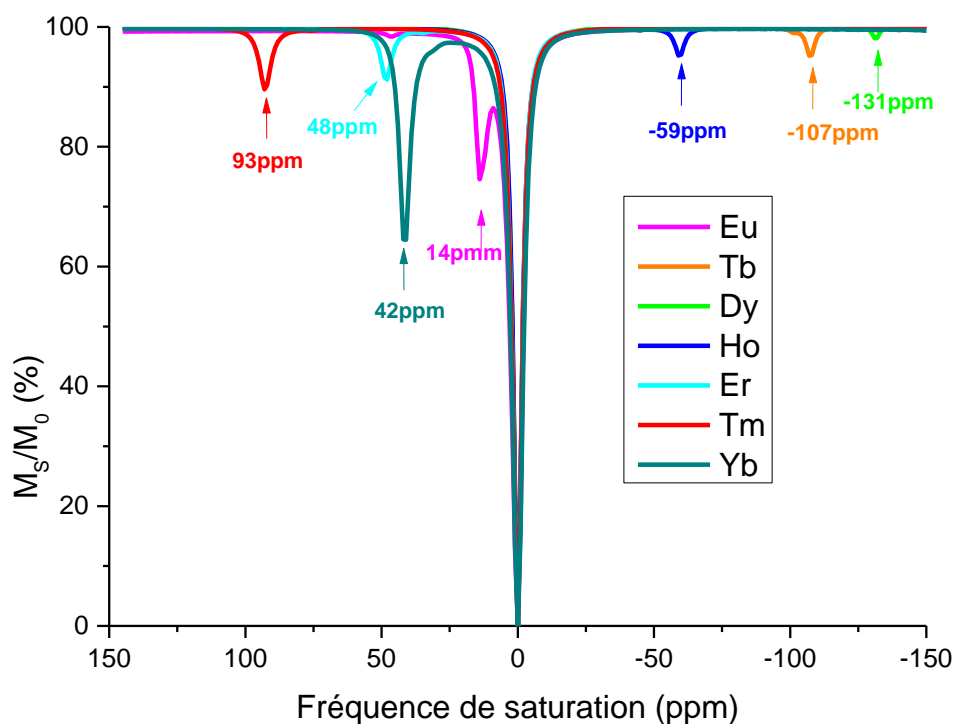


Figure 4.4 : Spectres CEST des complexes **Ln(DO3A-Py-Am(6))**, 20mM, 295K, pH 7

La distance de l'effet CEST par rapport au signal de l'eau ($\Delta\omega$) est un paramètre déterminant quant à l'efficacité CEST. En effet, les grands $\Delta\omega$ permettent des échanges chimiques plus rapides tout en restant dans le domaine d'échange lent. Les données reportées **figure 4.5** montrent l'influence de la nature de l'ion métallique paramagnétique sur le déplacement chimique du proton amide NH. Concernant les complexes **Ln(DO3A-Py-Am(6))**, les éléments situés aux extrémités de la série des Lanthanides possèdent les effets CEST les plus proches du pic de l'eau (complexes formés avec Eu^{3+} et Yb^{3+}). Plus la taille du lanthanide augmente (de Tm^{3+} à Tb^{3+}), plus le signal du proton labile est déplacé depuis les grandes fréquences positives vers les grandes fréquences négatives (**figure 4.5**).

Influence du lanthanide et de la nature du proton échangeable sur l'effet CEST

Cette tendance a également été observée par Terreno *et al.* pour différents complexes de Ln formés avec le ligand DOTAM-Gly [1]. Dans cet exemple reporté par Terreno *et al.*, tout comme dans le cas des résultats présentés ici, les effets CEST des complexes formés avec les ions Yb^{3+} et Eu^{3+} sont proches du signal de l'eau.

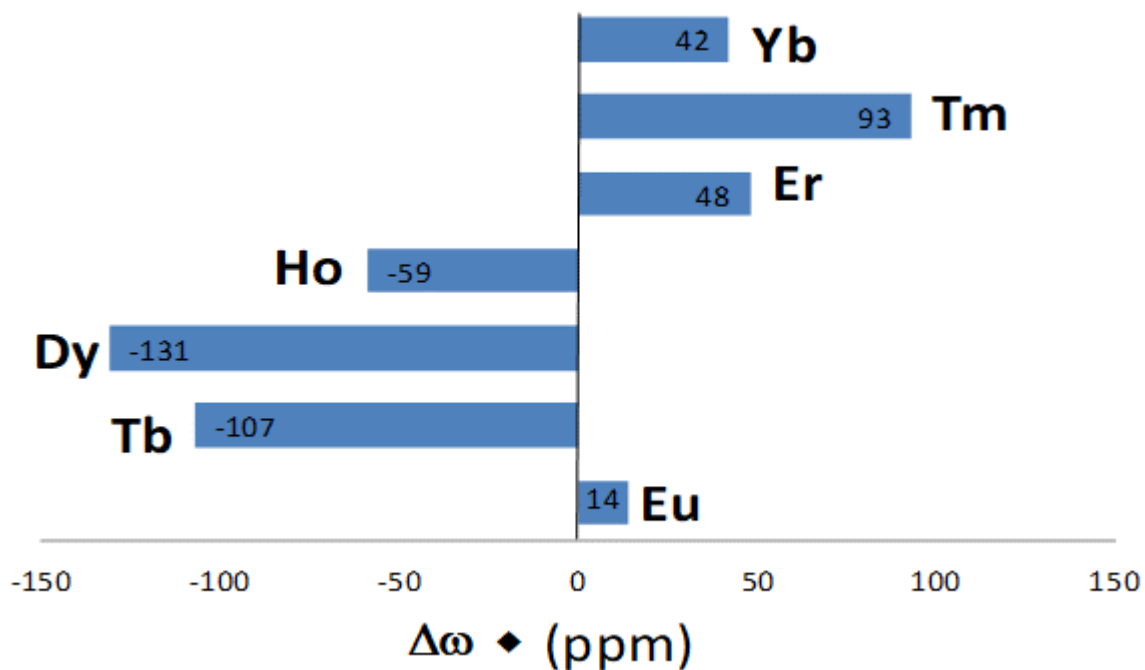


Figure 4.5 : Influence du lanthanide sur le déplacement chimique de l'effet CEST

Les déplacements chimiques du proton de l'amide donnant un effet CEST ainsi que les constantes de Bleaney sont donnés dans le **tableau 4.2**. L'influence de la nature du lanthanide sur le déplacement chimique des protons amide labiles des complexes **$\text{Ln}(\text{DO3A-Py-Am}(6))$** suit la tendance attendue compte tenu des différents effets de champ cristallin induits par les ions Ln^{3+} [8].

Chapitre 4

Tableau 4.2 : Déplacement chimique de l'effet CEST majoritaire pour les complexes de **Ln(DO3A-Py-Am(6))**

Ln	Ln(DO3A-Py-Am(6))	$\langle S_z \rangle$	C^D
Eu	+14	7.569	4.0
Tb	-107	31.853	-86
Dy	-131	28.565	-100
Ho	-59	22.642	-39
Er	+48	15.382	33
Tm	+93	8.210	53
Yb	+42	2.589	22

$\langle S_z \rangle$ est la valeur réduite du spin de polarisation moyen et C^D est la constante de Bleaney [8]

Les déplacements chimiques suivent le signe et l'amplitude de la constante de Bleaney (**tableau 4.2**). Le déplacement chimique $\delta_{i,Ln}^{para}$ d'un proton i , induit par le lanthanide, Ln est donné par l'équation 3.1

$$\delta_{i,Ln}^{para} = \delta_{i,Ln}^{exp} - \delta_{i,Ln}^{dia} = \delta_{i,Ln}^c + \delta_{i,Ln}^{pc} \quad 3.1$$

Le paramètre $\delta_{i,Ln}^{exp}$ correspond au déplacement chimique observé et $\delta_{i,Ln}^{dia}$ correspond à la contribution diamagnétique. Le déplacement paramagnétique est la somme des déplacements de contact ($\delta_{i,Ln}^c$) et de pseudo-contact ($\delta_{i,Ln}^{pc}$). Le terme « contact » provient des interactions à travers des liaisons chimiques et peut être exprimé tel que dans l'équation 3.2.

$$\delta_{i,Ln}^c = \langle S_z \rangle \frac{\mu_B}{3kT\gamma_I} \frac{A}{\hbar} 10^6 \quad 3.2$$

Où $\langle S_z \rangle$ est la valeur réduite du spin de polarisation moyen, μ_B est le magnéton de Bohr, k est la constante de Boltzmann, γ_I le ratio gyromagnétique du noyau observé, et A/\hbar la constante de couplage hyperfine (en $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$).

Influence du lanthanide et de la nature du proton échangeable sur l'effet CEST

La contribution pseudo-contact ou dipolaire résulte du champ magnétique local induit dans le noyau étudié par le moment magnétique de l'ion Ln^{3+} , et il peut être décrit dans l'axe magnétique principal (en coordonnées sphériques) (**équation 3.3**).

$$\delta_{i,\text{Ln}}^{pc} = \frac{C_j \mu_B^2}{60(kT)^2} \left[\frac{A_2^0 \langle r^2 \rangle (3\cos^2\theta - 1)}{r^3} + \frac{A_2^2 \langle r^2 \rangle \sin^2\theta \cos\varphi}{r^3} \right] \quad \mathbf{3.3}$$

Où C_j correspond à la constante de Bleaney, qui est caractéristique des ions Ln^{3+} , $A_2^0 \langle r^2 \rangle$ et $A_2^2 \langle r^2 \rangle$ sont les coefficients de champ de ligand au second degré [9].

Pour finir:

$$\frac{\delta_{i,\text{Ln}}^{para}}{\langle S_z \rangle} = \frac{\mu_B}{3kT\gamma_I \hbar} 10^6 + \frac{C_j}{\langle S_z \rangle} \frac{\mu_B^2}{60(kT)^2} \left[\frac{A_2^0 \langle r^2 \rangle (3\cos^2\theta - 1)}{r^3} + \frac{A_2^2 \langle r^2 \rangle \sin^2\theta \cos\varphi}{r^3} \right] \quad \mathbf{3.4}$$

En supposant que la constante de couplage hyperfin et les paramètres du champ cristallin ne changent pas de manière significative le long de la série Ln^{3+} , $\frac{\delta_{i,\text{Ln}}^{para}}{\langle S_z \rangle}$ tracé en fonction de $\frac{C_j}{\langle S_z \rangle}$ est linéaire pour une série de complexes de Ln^{3+} isostructuraux.

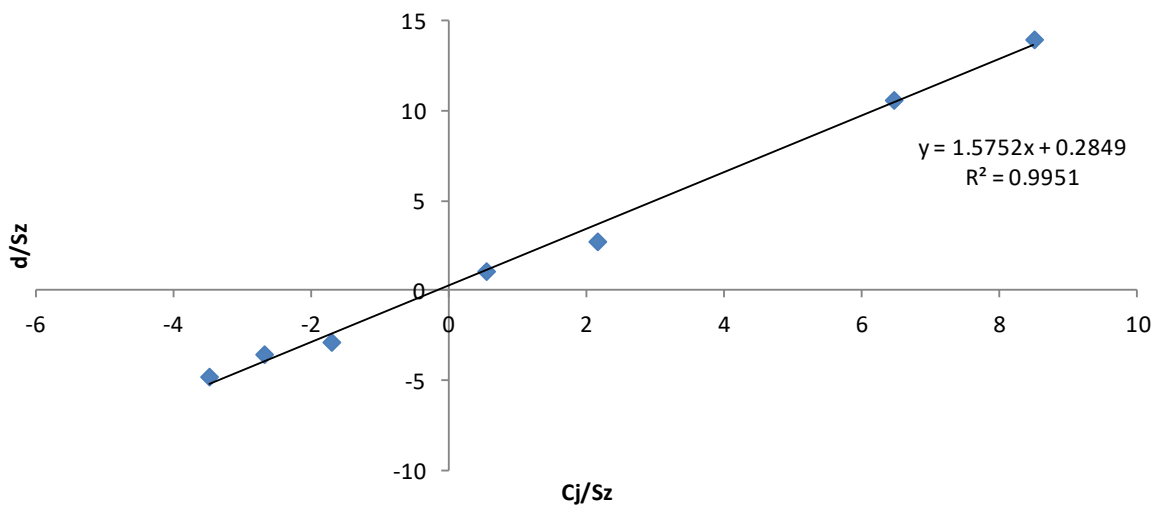


Figure 4.6 : Représentation de $\frac{\delta_{i,\text{Ln}}^{para}}{\langle S_z \rangle}$ en fonction de $\frac{C_j}{\langle S_z \rangle}$ pour les complexes $\text{Ln}(\text{DO3A-Py-AM}(6))$ ($\text{Ln} = \text{Eu, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb}$)

Chapitre 4

Le graphique présenté dans la **figure 4.6** correspond au tracé de $\frac{\delta_{i,Ln}^{para}}{\langle S_z \rangle}$ en fonction de $\frac{C_j}{\langle S_z \rangle}$ pour les différents effets CEST observés. Concernant la contribution diamagnétique, nous avons considéré le déplacement chimique du proton NH échangeable du complexe de Lu³⁺. Considérant l'hypothèse raisonnable que le complexe d'Yb³⁺ soit présent seulement en conformation SAP [10], nous pouvons conclure que les pics CEST majoritaires observés (pour les cas où plusieurs isomères sont présents), proviennent de complexes en conformation SAP.

L'intensité de l'effet CEST est également un paramètre important à prendre en compte puisqu'il témoigne de l'efficacité de l'agent de contraste. La valeur M_s/M_0 (%) est directement proportionnelle à k_{ex} donc un effet CEST intense témoigne d'un échange chimique rapide [2]. Dans les mêmes conditions expérimentales, le complexe formé avec l'ytterbium (**Yb(DO3A-Py-Am(6))**) montre l'effet CEST le plus intense alors que le complexe formé avec le Dysprosium (**Dy(DO3A-Py-Am(6))**) présente l'effet CEST le plus faible. Ici encore l'intensité de l'effet CEST dépend de la nature du lanthanide.

La figure 4.7 représente l'intensité de l'effet CEST en fonction du lanthanide complexé. Ces données montrent que l'effet CEST est plus intense pour les ions Ln³⁺ possédant les rayons atomiques les plus grands et les plus petits (Eu³⁺ et Yb³⁺), alors que les ions Ln³⁺ donnant lieu aux effets CEST les plus faibles se situent au milieu de la série. Cette observation a déjà été reportée lors de l'étude de différents complexes de lanthanide formés à partir du ligand DOTAM-Gly, pour lequel l'effet CEST provient également d'un proton amide [2].

Influence du lanthanide et de la nature du proton échangeable sur l'effet CEST

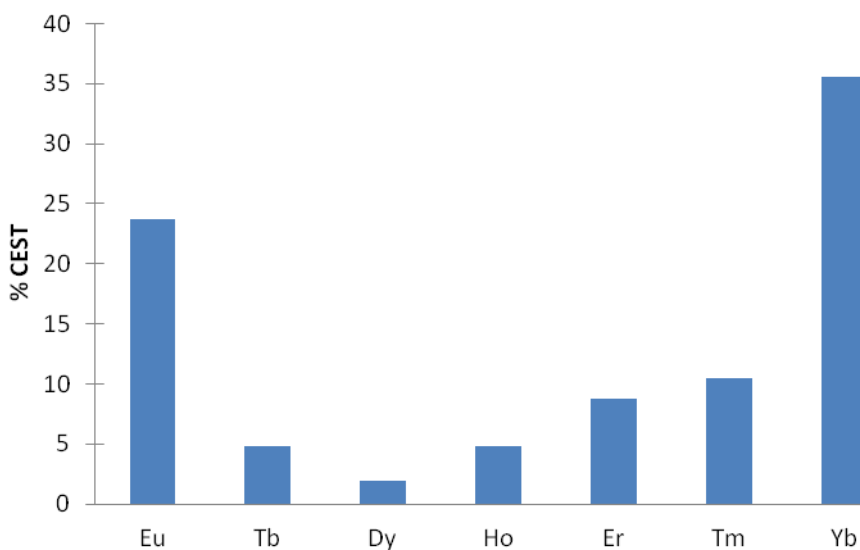


Figure 4.7 : Représentation de l'intensité de l'effet CEST en fonction du lanthanide complexé, 20mM, 295K, pH 7.

Les résultats présentés ici, confirment que les propriétés intrinsèques aux lanthanides, influencent de manière non équivoque le déplacement chimique du proton donnant un effet CEST, ainsi que de l'intensité de celui-ci. Cependant, ces paramètres restent difficiles à prévoir étant donné qu'ils peuvent aussi être influencés par d'autres paramètres tels que la distance du proton labile avec le métal, ou encore la nature du proton échangeable.

4.3.2. Influence de la nature du proton échangeable sur l'effet CEST : comparaison entre un proton amide et carbamate

Il reste difficile à évaluer comment la nature du proton échangeable (COONH, OH, NH₂, SH, etc.) influence l'effet CEST. En effet, dans la majorité des cas, échanger un groupement de protons labiles par un autre sur une même structure moléculaire, entraîne un changement de la distance de celui-ci par rapport au lanthanide, provoquant alors une modification des propriétés de l'effet CEST.

Chapitre 4

De part leurs fortes similitudes structurales, les ligands **DO3A-Py-Am(6)** et **DO3A-Py-Cbz(6)** permettent une comparaison. La différence de structure entre ces deux ligands réside sur le fait que le groupement éthylbenzène soit lié en position 6 de la pyridine, par le biais d'un groupement carbamate (**DO3A-Py-Cbz(6)**) ou amide (**DO3A-Py-Am(6)**). L'effet CEST engendré par le proton amide de **DO3A-Py-Am(6)** et l'effet CEST généré par le proton carbamate de **DO3A-Py-Cbz(6)** ont pu être comparé pour différents complexes de lanthanides (**tableau 4.3**).

Tableau 4.3 : Comparaison des effets CEST obtenus pour différents complexes de lanthanide formés avec les ligands **DO3A-Py-Am(6)** et **DO3A-Py-Cbz(6)**.

	Pr	Nd	Eu	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb
Ln(DO3A-Py-Am(6))	-	-	14ppm	-107ppm -96ppm	-131ppm	-59ppm	48ppm	93ppm	42ppm
Ln(DO3A-Py-Cbz(6))	-	-	11ppm	-117ppm -106ppm	-138ppm	-63ppm	56ppm	98ppm	40ppm

Il est intéressant de constater que quelque soit le lanthanide complexé, le déplacement chimique du proton amide (dans le cas de **(DO3A-Py-Am(6))**) ou carbamate (dans le cas de **DO3A-Py-Cbz(6)**) n'est peu ou pas modifié.

L'étude cristallographique des composés **Gd(DO3A-Py-Am(6))** et **Gd(DO3A-Py-Cbz(6))** montre de grandes similitudes structurales entre les deux complexes (**figure 4.8**). En effet, dans une même conformation SAP, les distances interatomiques entre l'ion Gd^{3+} et les atomes H32, O34 et C32 respectivement sont très similaires pour les deux complexes (**tableau4.4**). Ainsi, dans le cas des dérivés carbamates et amides présentés ici, le déplacement chimique de l'effet CEST n'est pas modifié par la nature du proton échangeable, mais par la distance de celui-ci avec le lanthanide (*cf* Chapitre 2).

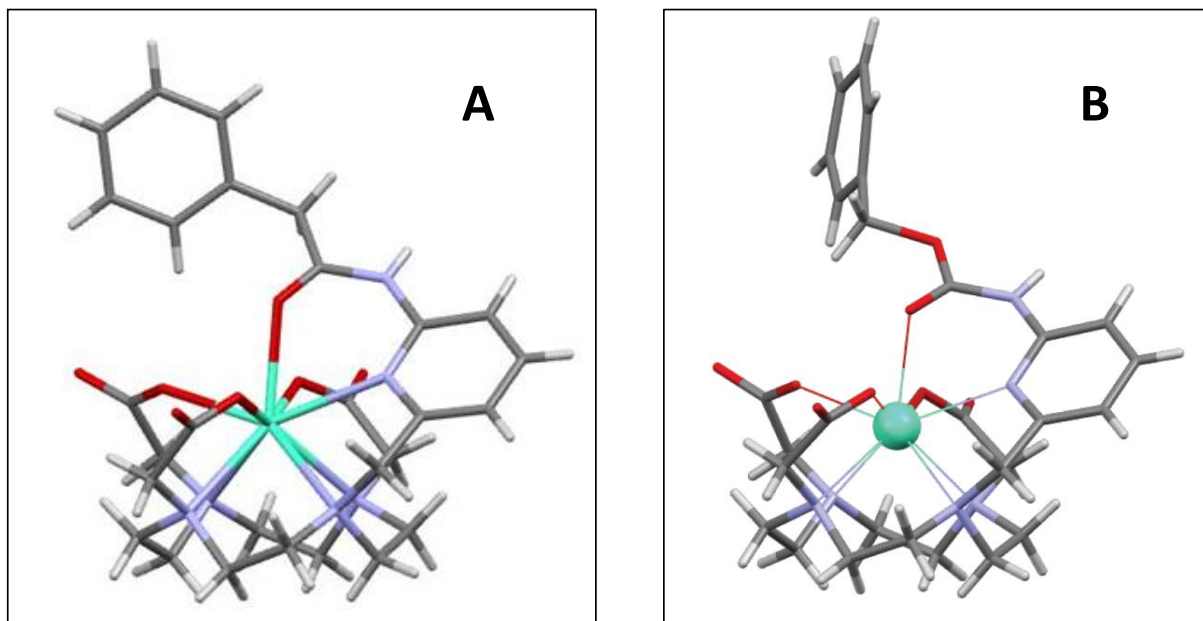
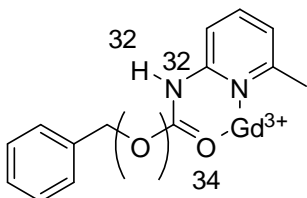


Figure 4.8 : Structures cristallographiques des complexes **Gd(DO3A-Py-Am(6))** (A) et **Gd(DO3A-Py-Cbz(6))** (B)

Tableau 4.4 : Comparaison des distances interatomiques entre l'ion Gd³⁺ et les atomes H32, O34 et N32 pour les complexes **Gd(DO3A-Py-Am(6))** et **Gd(DO3A-Py-Cbz(6))**.

	Gd-H32 (Å)	Gd-O34 (Å)	Gd-N32 (Å)
Gd(DO3A-Py-Am(6))	4.48(7)	2.447(4)	3.751(4)
Gd(DO3A-Py-Cbz(6))	4.52(2)	2.428(2)	3.698(3)



La figure représente le positionnement des atomes d'intérêt sur la structure moléculaire.

4.4. Influence du pH et constantes de vitesse d'échange

Seuls les complexes **Ho(DO3A-Py-Am(6))**, **Er(DO3A-Py-Am(6))**, **Tm(DO3A-Py-Am(6))** et **Yb(DO3A-Py-Am(6))** présentent des effets CEST suffisamment intenses et séparés du signal de l'eau pour permettre les études reportées ci-dessous. Les mesures concernant le complexe **Yb(DO3A-Py-Am(6))** ont été réalisées au sein du laboratoire par Agnès Pallier.

4.4.1. Détermination de la présence d'isomères en solution

L'étude détaillée des effets CEST nécessite de savoir si plusieurs isomères de conformation sont présents en solution. La présence d'isomères en solution peut-être mise en évidence au regard des spectres RMN ^1H des différents complexes de lanthanide étudiés. Concernant les composés **Ho(DO3A-Py-Am(6))**, **Er(DO3A-Py-Am(6))**, **Tm(DO3A-Py-Am(6))** et **Yb(DO3A-Py-Am(6))**, il est possible de dénombrer une trentaine de pics sur les spectres RMN ^1H , ce qui correspond aux 35 signaux attendus pour les complexes formés avec **(DO3A-Py-Am(6))** dans le cadre d'une symétrie C1 (**figure 4.9**). Ces observations indiquent la présence d'une seule espèce en solution pour chacun des quatre complexes étudiés.

Comme nous l'avons discuté plus haut, il est raisonnable de supposer que les composés **Ho(DO3A-Py-Am(6))**, **Er(DO3A-Py-Am(6))**, **Tm(DO3A-Py-Am(6))** et **Yb(DO3A-Py-Am(6))** adoptent une conformation SAP en solution, étant donné que la proportion en isomère SAP augmente le long de la série des lanthanides [10] et que ces composés appartiennent à la fin de la série. Les signaux des Hydrogènes axiaux (H_{ax}) appartenant au macrocycle peuvent également donner une indication quant à la conformation SAP ou TSAP des complexes [3]. Ces H_{ax} sont les signaux les plus déplacés sur les spectres ^1H RMN. Les fréquences de résonance de ces protons se situent en général aux alentours de 30-50 ppm et 150-160 ppm pour les conformations SAP des complexes d' Eu^{3+} et d' Yb^{3+} pour les dérivés du DOTA, et à des fréquences plus faibles ($\cong 20$ ppm pour Eu^{3+} et $\cong 60$ ppm pour Yb^{3+}) pour les complexes en conformation TSAP [11]. Sur les spectres RMN présentés **figure 4.9** les H_{ax} du macrocycle sont identifiés entre 160 et 210 ppm pour **Ho(DO3A-Py-Am(6))**, entre 110 et 130 ppm pour **Er(DO3A-Py-Am(6))**, entre 250 et 290 ppm pour **Tm(DO3A-Py-Am(6))** et entre 80 et 120 ppm pour **Yb(DO3A-Py-Am(6))**. Ces résultats sont également en accord avec la conformation SAP des quatre complexes présentés.

Influence du lanthanide et de la nature du proton échangeable sur l'effet CEST

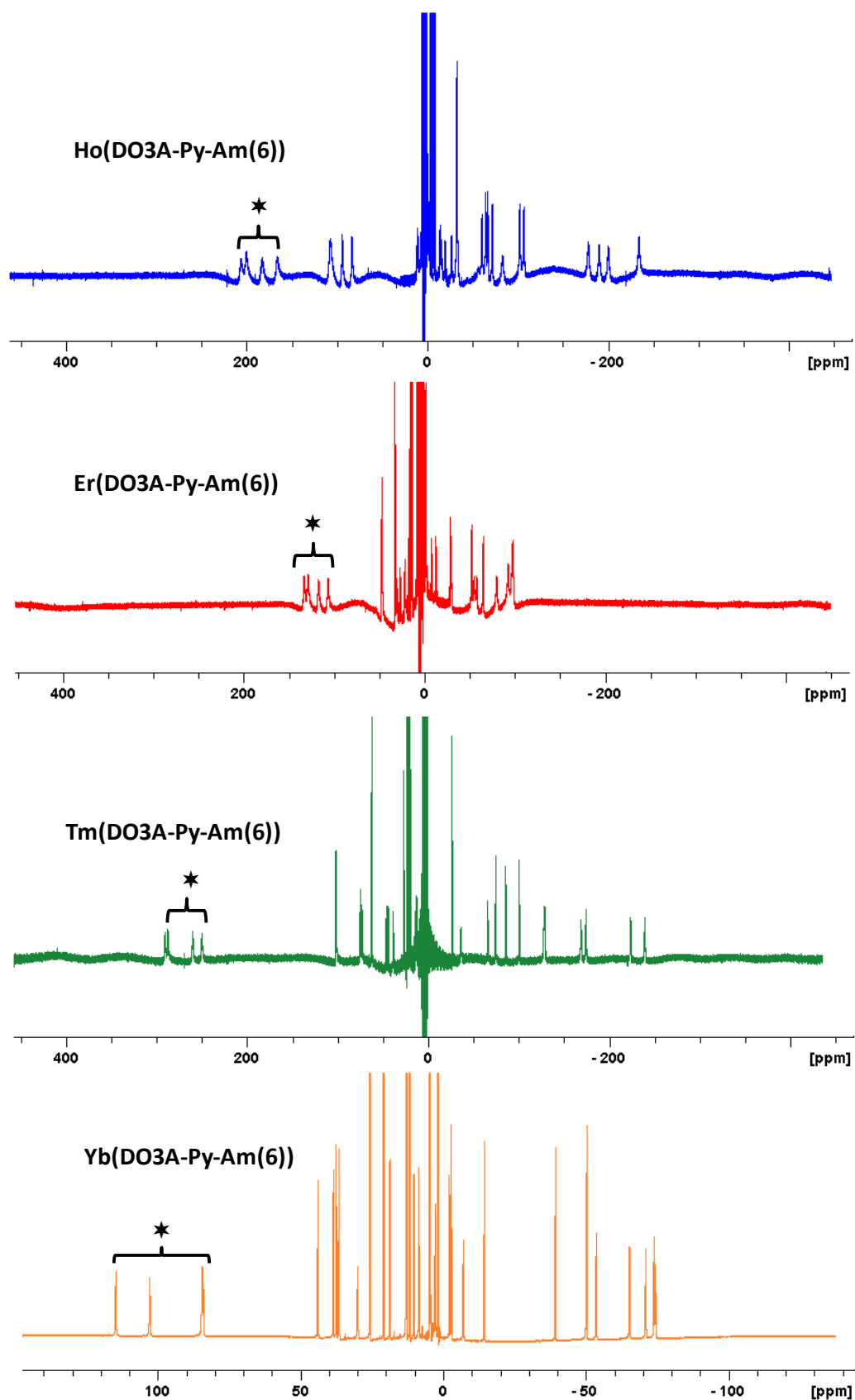


Figure 4.9 : Spectre ^1H RMN des composés **Ho(DO3A-Py-Am(6))**, **Er(DO3A-Py-Am(6))**, **Tm(DO3A-Py-Am(6))**, et **Yb(DO3A-Py-Am(6))** 298K, 20mM, pH7.4, * représente les H_{ax} appartenant au macrocycle

4.4.2. Influence du pH sur l'effet CEST

Afin d'étudier la dépendance au pH des effets CEST, des expériences paraCEST ont été répétées à différents pH mais dans les mêmes conditions de concentration et de température (295K, 20mM) avec un temps de saturation de 3s à une puissance de 25 μ T. Les résultats obtenus sont montrés dans la **figure 4.10**. L'effet CEST montre une dépendance au pH très marquée pour chacun des complexes étudiés. Il présente un maximum aux alentours de pH 7.5-8 et est négligeable pour des pH<6. L'effet CEST indique une dépendance linéaire pour des pH compris entre 6 et 8, alors qu'il devient moins efficace pour des plus hautes valeurs de pH (**figure 4.10 B**).

Influence du lanthanide et de la nature du proton échangeable sur l'effet CEST

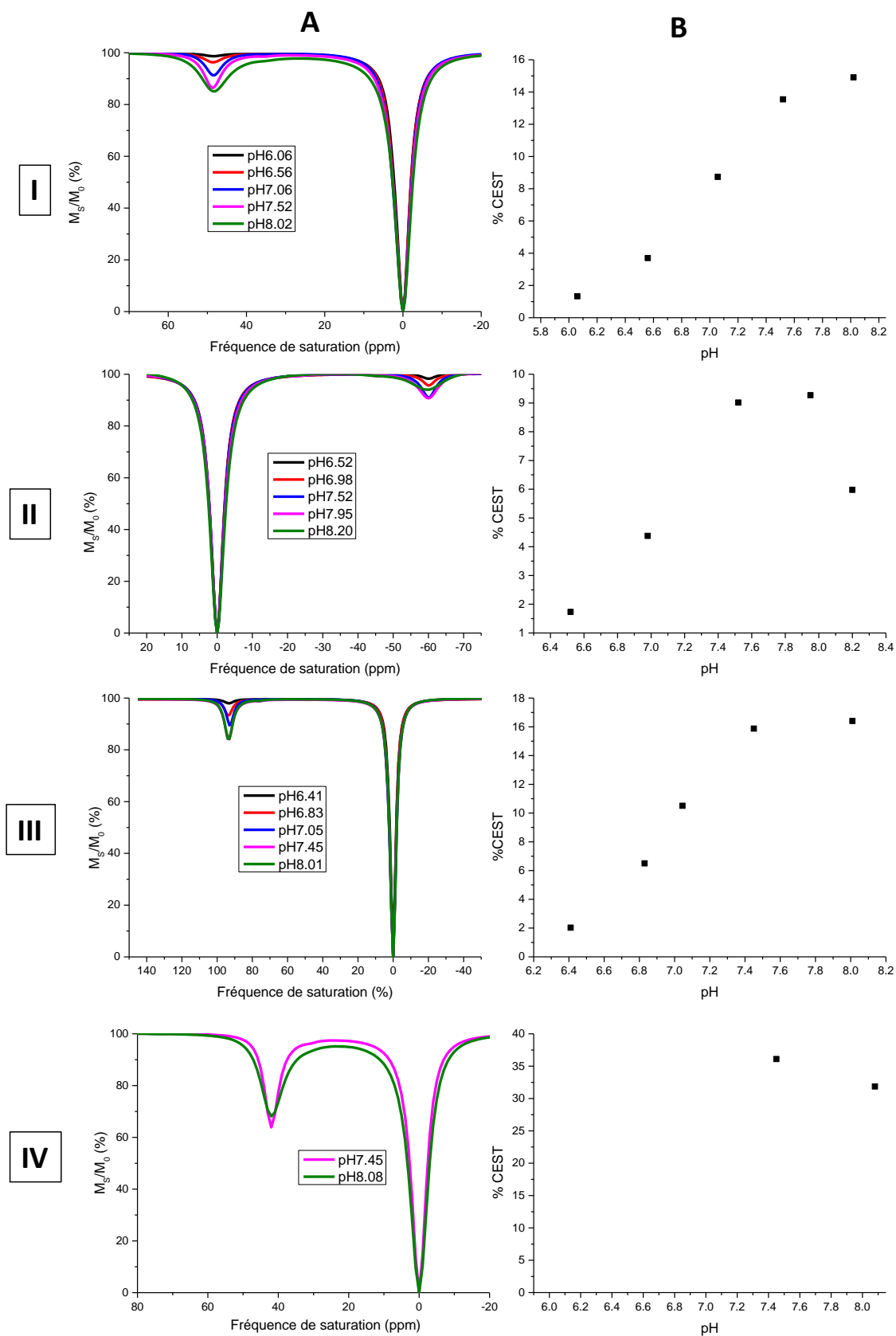
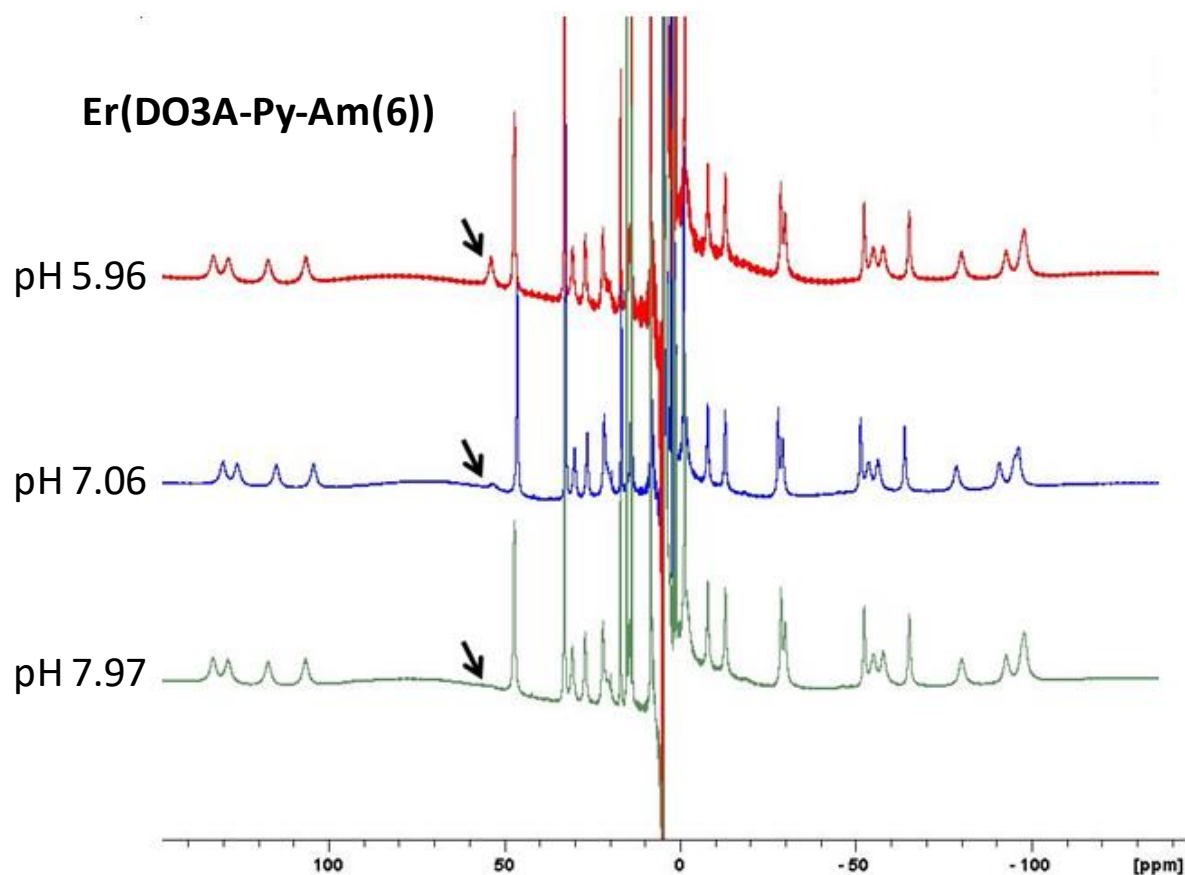


Figure 4.10 : Spectres CEST des complexes Er(DO3A-Py-Am(6)) (I), Ho(DO3A-Py-Am(6)) (II), Tm(DO3A-Py-Am(6)) (III) et Yb(DO3A-Py-Am(6)) (IV), 295K, 20mM obtenus à différents pH (A), et évolution de l'intensité de l'effet CEST en fonction du pH (B).

Chapitre 4

Le proton en échange chimique avec les protons de l'eau a pu être mis en évidence sur les spectres RMN ^1H pour les complexes **Ho(DO3A-Py-Am(6))**, **Er(DO3A-Py-Am(6))** et **Tm(DO3A-Py-Am(6))** (figure 4.11).

L'influence du pH a également pu être vérifiée sur le signal du proton amide sur les spectres RMN ^1H . Pour chacun des spectres étudiés, le signal du proton labile s'élargit lorsque le pH augmente jusqu'à disparaître au-delà de pH 8, indiquant une augmentation de la vitesse d'échange des protons lorsque le pH augmente.



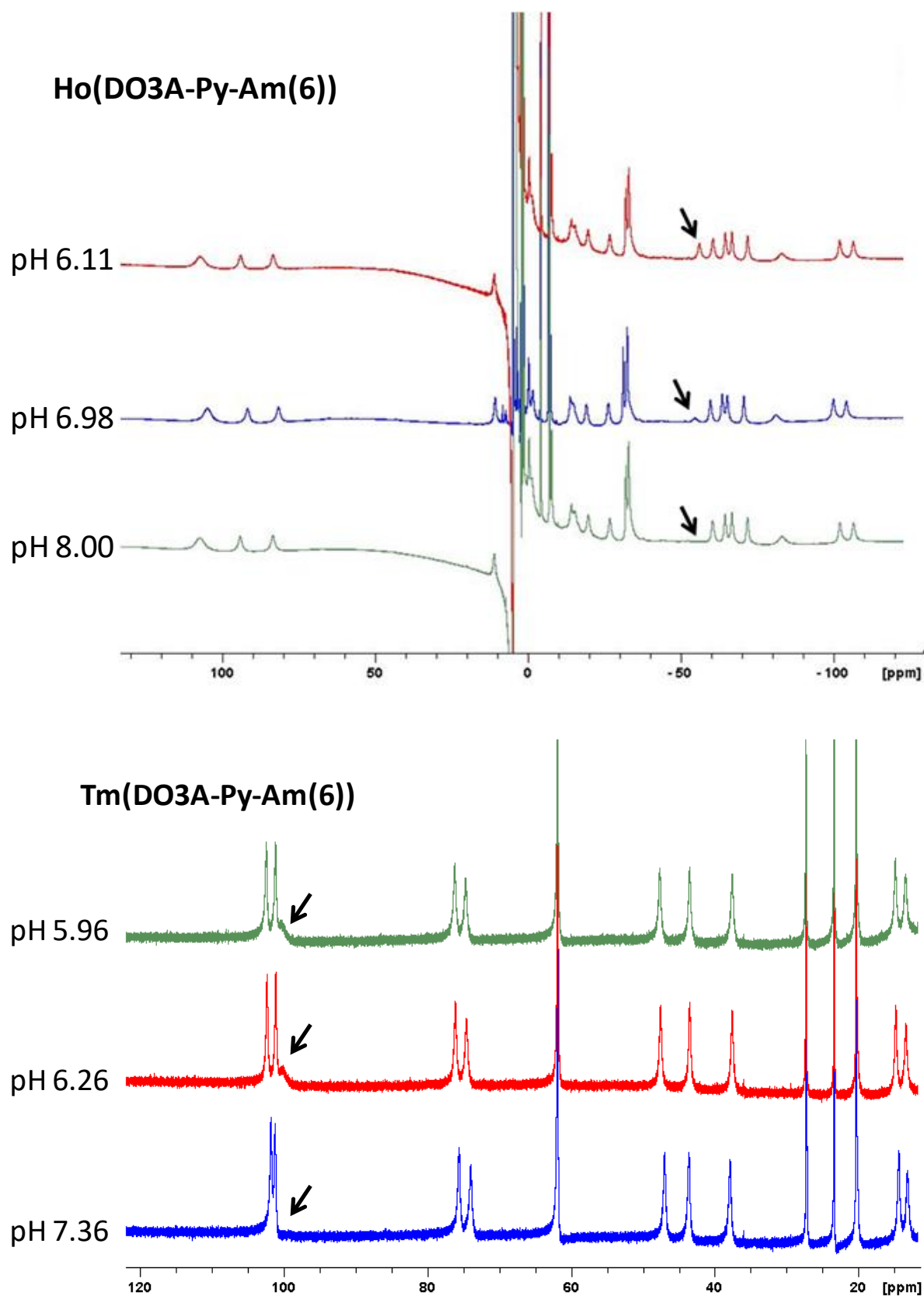


Figure 4.11 : Spectres RMN ¹H obtenus à 400MHz pour les composés **Er(DO3A-Py-Am(6))**, **Ho(DO3A-Py-Am(6))** et **Tm(DO3A-Py-Am(6))**, 295K, 20mM dans H₂O/D₂O (95 :5), obtenus à différents pH.

Chapitre 4

Il est important de souligner que l'intensité des effets CEST présentés ici est optimale pour une gamme de pH comprise entre 6 et 8, qui convient parfaitement à une utilisation en milieu biologique.

4.4.3. Détermination des constantes de vitesse d'échange k_{ex}

Un seul isomère étant présent en solution pour chacun des quatre complexes étudiés, la détermination des constantes de vitesse d'échange (k_{ex}) peut se faire par les méthodes linéaires indépendantes de la concentration (oméga-plot et HW-QUEST) mais aussi par les méthodes QUEST et QUEST qui elles, nécessitent la connaissance de la concentration en complexe.

Afin de déterminer les constantes de vitesse d'échange du proton NH labile, des expériences de quantification de la vitesse d'échange par modification de la puissance de saturation (QUEST) et par modification du temps de saturation (QUEST) ont été réalisés. Les études QUEST ont été effectuées à différents pH par application d'une fréquence de saturation tous les 0.5ppm à des puissances comprises entre 0.18 et 76 μ T (délai de saturation de 3s) et les expériences QUEST ont été effectuées pour différents pH à des temps de saturation compris entre 0.25 et 4s (puissance de saturation de 25 μ T).

Les données obtenues par les expériences de QUEST et QUEST ont été ajustées d'après les **équations 2.6 et 2.7** (*cf.* Chapitre 2).

Les résultats des expériences QUEST et QUEST sont représentés **figure 4.12**. Seuls les pH compris entre 6.5 et 8 ont été pris en compte pour déterminer les constantes de vitesse d'échange, en effet, l'effet CEST est trop faible à $\text{pH} < 6.5$ et trop élargi à $\text{pH} > 8$ pour permettre une détermination fiable du k_{ex} . Les valeurs $1-M_s/M_0$ sont représentées pour le point d'intensité maximum de l'effet CEST situé à -59ppm pour **Ho(DO3A-Py-Am(6))**, 48ppm pour **Er(DO3A-Py-Am(6))**, 93ppm pour **Tm(DO3A-Py-Am(6))** et 42ppm pour **Yb(DO3A-Py-Am(6))**. Les courbes en trait plein représentent le meilleur ajustement aux **équations 2.6** (QUEST) et **2.7** (QUEST) (*équations : cf.* Chapitre 2).

Influence du lanthanide et de la nature du proton échangeable sur l'effet CEST

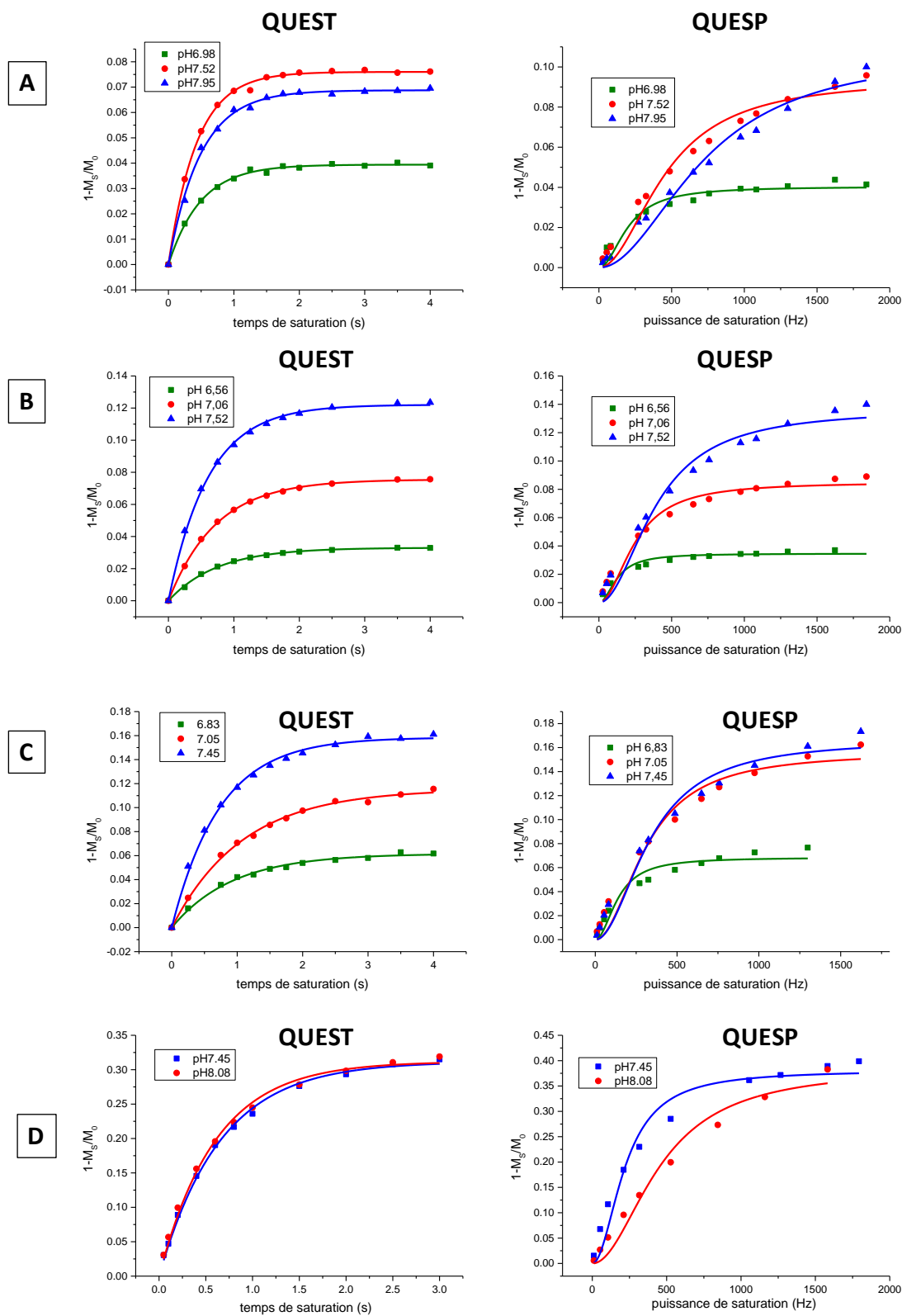


Figure 4.12 : Tracés QUEST et QUESP pour les complexes **Ho(DO3A-Py-Am(6))** (A), **Er(DO3A-Py-Am(6))** (B), **Tm(DO3A-Py-Am(6))** (C), et **Yb(DO3A-Py-Am(6))** (D) à différents pH. Les courbes en trait pleins représentent le meilleur ajustement des points expérimentaux aux équations 2.6 (QUEST) et 2.7 (QUESP) (équations : cf. Chapitre 2), 395K, $[\text{Ho}(\text{DO3A-Py-Am}(6))] = 19.14 \text{ mM}$, $[\text{Er}(\text{DO3A-Py-Am}(6))] = 18.2 \text{ mM}$, $[\text{Tm}(\text{DO3A-Py-Am}(6))] = 18.35 \text{ mM}$ et $[\text{Yb}(\text{DO3A-Py-Am}(6))] = 24.7 \text{ mM}$.

Chapitre 4

A partir des expériences QUESP, deux méthodes de calcul de k_{ex} indépendantes de la concentration peuvent être utilisées. La première méthode indépendante de la concentration utilisée est la méthode « oméga-plot » [12].

Le tracé de $M_S/(M_0-M_S)$ en fonction de $1/\omega_I^2$ donne une droite linéaire dont l'intersection avec l'axe des abscisses permet d'obtenir un accès direct à la vitesse d'échange $1/k_{ex}^2$ (équation 2.8, cf. Chapitre 2).

La deuxième méthode, dérivée de la méthode « oméga-plot » est la méthode Hannes-Woolf QUESP (HW-QUESP) [13] (équation 2.9, cf. Chapitre 2).

Le tracé de $(\omega_I^2 M_S)/(M_0-M_S)$ en fonction de ω_I^2 donne une droite dont l'intersection avec l'axe des abscisses donne un accès direct à la vitesse d'échange k_{ex}^2 (équation 2.10 cf. Chapitre 2).

Les tracés des méthodes linéaires ω -plot et HW-QUESP sont représentés **figure 4.13**.

Influence du lanthanide et de la nature du proton échangeable sur l'effet CEST

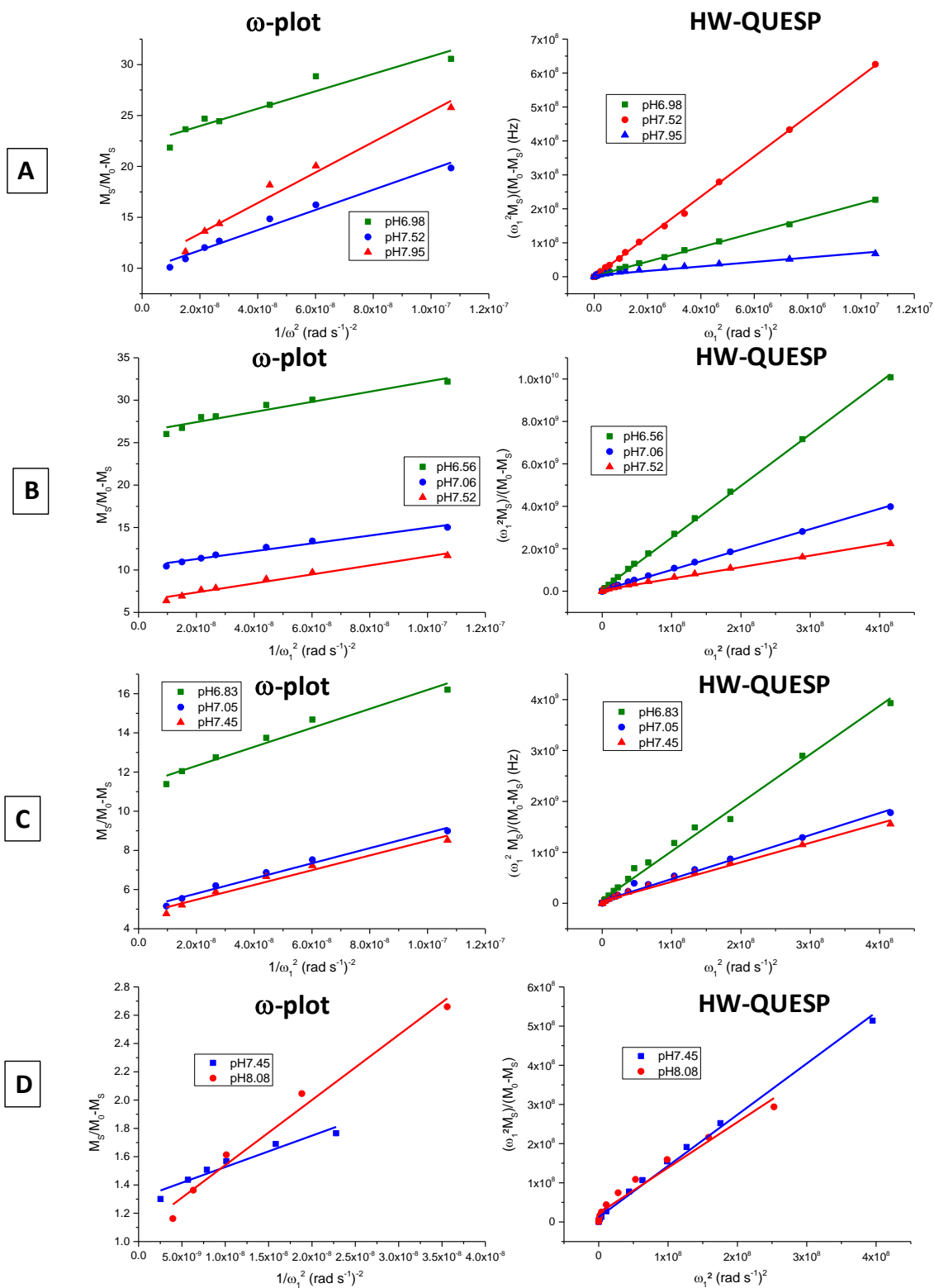


Figure 4.13: Tracés ω -plot et HW-QUESP pour les complexes $\text{Ho}(\text{DO3A-Py-Am}(6))$ (A), $\text{Er}(\text{DO3A-Py-Am}(6))$ (B), $\text{Tm}(\text{DO3A-Py-Am}(6))$ (C) et $\text{Yb}(\text{DO3A-Py-Am}(6))$ (D), à différents pH. Les courbes en trait pleins représentent le meilleur ajustement linéaire des points expérimentaux. Mesures effectuées à 300K pour $[\text{Ho}(\text{DO3A-Py-Am}(6))]= 19.14$ mM, $[\text{Er}(\text{DO3A-Py-Am}(6))]= 18.2$ mM, $[\text{Tm}(\text{DO3A-Py-Am}(6))]= 18.35$ mM et $[\text{Yb}(\text{DO3A-Py-Am}(6))]= 24.7$ mM.

Chapitre 4

Les valeurs de constantes de vitesse d'échange obtenues par les quatre méthodes analytiques employées sont données dans le **tableau 4.5**.

Tableau 4.5 : Valeurs de k_{ex} obtenues pour les complexes **Ho(DO3A-Py-Am(6))**, **Er(DO3A-Py-Am(6))**, **Tm(DO3A-Py-Am(6))**, et **Yb(DO3A-Py-Am(6))**, à 300K.

	pH	k_{ex} (s ⁻¹) oméga-plot	k_{ex} (s ⁻¹) H-W QUESP	k_{ex} (s ⁻¹) QUESP	k_{ex} (s ⁻¹) QUEST
Ho(DO3A-Py-Am(6))	6.98	1970±100	1783±300	1426±500	3030±100
	7.52	3370±300	3357±500	3411±500	5943±200
	7.95	4431±600	4889±500	4517±500	5300±300
Er(DO3A-Py-Am(6))	6.56	1601±500	1794±200	1200±500	1700±300
	7.06	2204±500	2096±200	1930±500	3900±300
	7.52	3068±200	2989±200	3210±500	6214±1000
Tm(DO3A-Py-Am(6))	6.83	2365±500	2507±600	1100±500	2500±500
	7.05	2935±400	3197±400	2800±500	4000±500
	7.45	3038±400	3189±400	4150±500	7500±1000
Yb(DO3A-Py-Am(6))	7.45	2976±500	3050±500	2713±500	2246 ±500
	8.08	4970±300	4365±300	4628±300	2344±1000

Quel que soit le complexe étudié, les valeurs de k_{ex} obtenues par les méthodes oméga-plot, H-W QUESP et QUESP sont très similaires, ce n'est pas surprenant puisque les mêmes données expérimentales sont utilisées pour déterminer k_{ex} par chacune de ces trois méthodes. La cohérence de ces résultats indique une bonne fiabilité des méthodes de calcul que ce soit pour les méthodes dépendantes ou indépendantes de la concentration en complexe. En revanche, les valeurs de k_{ex} déterminées par la méthode QUEST sont toutes légèrement supérieures aux valeurs déterminées à partir des données QUESP, mais restent néanmoins du même ordre de grandeur.

Influence du lanthanide et de la nature du proton échangeable sur l'effet CEST

Il est déjà établi que les constantes de vitesse d'échange des protons amide sont fortement dépendantes du pH de la solution [2,14]. Comme attendu, pour les complexes étudiés ici, la valeur de k_{ex} augmente lorsque le pH augmente confortant l'hypothèse que l'effet CEST est favorisé par un échange chimique catalysé en milieu basique.

Tableau 4.6 : Comparaison des valeurs de k_{ex} en fonction du lanthanide pour les complexes formés avec **DO3A-Py-Am(6)** et **DO3A-Py-Cbz(6)**

		Ho	Er	Tm	Yb
DO3A-Py-Am(6)	pH	7.52	7.52	7.45	7.45
	k_{ex} (s ⁻¹) ^a	3370	3068	3038	2976
DO3A-Py-Cbz(6)	pH	7.10	7.42	7.43	7.41
	k_{ex} (s ⁻¹) ^a	4000	4900	3900	6100 ^b

a : déterminées par la méthode oméga-plot. b : valeurs déterminée à 37°C réf. [6]

La comparaison des constantes de vitesse d'échange à un pH donné ne montre pas de variation significative de k_{ex} en fonction du lanthanide (**tableau 4.6**). Cependant, les lanthanides étudiés appartiennent tous à la fin de la série, afin d'avoir une tendance générale, les k_{ex} des plus gros lanthanides paramagnétiques doivent également être pris en compte. Néanmoins Terreno *et al.* ont montré pour Ln-DOTAMGly que la constante de vitesse d'échange des protons amide n'est pas particulièrement influencée par la nature du lanthanide, ils ont déterminé des valeurs de k_{ex} allant de 128.5s⁻¹ pour Pr-DOTAMGly à 180.0s⁻¹ pour Yb-LnDOTAMGly (valeurs déterminées à pH 7.4, 312K) [2].

La comparaison des valeurs de k_{ex} pour les complexes formés avec le **DO3A-Py-Am(6)** et **DO3A-Py-Cbz(6)** montre de manière générale une vitesse d'échange plus rapide pour le proton du carbamate (**Ln(DO3A-Py-Cbz(6))**) que pour le proton de l'amide (**Ln(DO3A-Py-Am(6))**). Cette observation peut s'expliquer par la présence de l'oxygène sur le carbamate, qui entraîne par effets mésomères la délocalisation des doublets non liants de l'oxygène vers l'azote. Ainsi, le NH du carbamate est plus acide que celui de l'amide et donc plus labile, expliquant des vitesses d'échange plus élevées.

4.5. Conclusion

Les propriétés LIS intrinsèques aux lanthanides permettent d'obtenir des effets CEST d'intensités différentes et à des déplacements chimiques différents en fonction du lanthanide complexé à partir d'une même structure chélatante. Dans la série **Ln(DO3A-Py-Am(6))**, le complexe du Dy(III) a montré l'effet CEST possédant le déplacement chimique le plus important par rapport au signal de l'eau, mais présente une intensité faible (< 5%). En revanche, le complexe **Yb(DO3A-Py-Am(6))**, peut être considéré comme étant le composé le plus intéressant, puisqu'il est suffisamment séparé du signal de l'eau pour permettre une saturation sélective et qu'il possède l'effet le plus intense (> 35%). L'analyse des déplacements chimiques paramagnétiques pour toute la série des lanthanides, a permis de conclure une structure identique pour tous les complexes présents en un seul isomère ainsi que pour l'isomère majoritaire des complexes pour lesquels deux isomères sont observés. Nous avons également confirmé dans cette étude que la constante de vitesse d'échange du proton amide et, par conséquent, l'effet CEST sont fortement dépendants du pH. Dans ce cas précis, la nature du proton (carbamate ou amide) n'a pas d'influence significative sur le déplacement chimique de l'effet CEST car les complexes carbamate et amide sont quasiment isostructuraux comme démontrent les spectres de RMN de ^1H et les études cristallographiques, en revanche, le carbamate semble favoriser des échanges plus rapides.

4.6. Références

- (1) Aime, S.; Barge, A.; Delli Castelli, D.; Fedeli, F.; Mortillaro, A.; Nielsen, F. U.; Terreno, E.: Paramagnetic Lanthanide(III) complexes as pH-sensitive chemical exchange saturation transfer (CEST) contrast agents for MRI applications. *Magnetic Resonance in Medicine* **2002**, *47*, 639-648.
- (2) Terreno, E.; Castelli, D. D.; Cravotto, G.; Milone, L.; Aime, S.: Ln(III)-DOTAMGly Complexes: A Versatile Series to Assess the Determinants of the Efficacy of Paramagnetic Chemical Exchange Saturation Transfer Agents for Magnetic Resonance Imaging Applications. *Investigative Radiology* **2004**, *39*, 235-243.
- (3) Slack, J. R.; Woods, M.: The effect of regioisomerism on the coordination chemistry and CEST properties of lanthanide(III) NB-DOTA-tetraamide chelates. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2014**, *19*, 173-189.
- (4) Carney, C. E.; Tran, A. D.; Wang, J.; Schabel, M. C.; Sherry, A. D.; Woods, M.: Towards the Rational Design of MRI Contrast Agents: δ -Substitution of Lanthanide(III) NB-DOTA-Tetraamide Chelates Influences but Does Not Control Coordination Geometry. *Chemistry – A European Journal* **2011**, *17*, 10372-10378.
- (5) Aime, S.; Delli Castelli, D.; Terreno, E.: Supramolecular Adducts between Poly-L-arginine and [TmIIIldotp]: A Route to Sensitivity-Enhanced Magnetic Resonance Imaging–Chemical Exchange Saturation Transfer Agents. *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *42*, 4527-4529.
- (6) He, J.; Bonnet, C. S.; Eliseeva, S. V.; Lacerda, S.; Chauvin, T.; Retailleau, P.; Szeremeta, F.; Badet, B.; Petoud, S.; Tóth, É.; Durand, P.: Prototypes of Lanthanide(III) Agents Responsive to Enzymatic Activities in Three Complementary Imaging Modalities: Visible/Near-Infrared Luminescence, PARACEST-, and T1-MRI. *Journal of the American Chemical Society* **2016**.
- (7) Beeby, A.; M. Clarkson, I.; S. Dickins, R.; Faulkner, S.; Parker, D.; Royle, L.; S. de Sousa, A.; A. Gareth Williams, J.; Woods, M.: Non-radiative deactivation of the excited states of europium, terbium and ytterbium complexes by proximate energy-matched OH, NH and CH oscillators: an improved luminescence method for establishing solution hydration states. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **1999**, 493-504.
- (8) Peters, J. A.; Huskens, J.; Raber, D. J.: Lanthanide induced shifts and relaxation rate enhancements. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **1996**, *28*, 283-350.
- (9) Platas-Iglesias, C.: The Solution Structure and Dynamics of MRI Probes Based on Lanthanide(III) DOTA as Investigated by DFT and NMR Spectroscopy. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2012**, 2012, 2023-2033.
- (10) Aime, S.; Botta, M.; Fasano, M.; Marques, M. P. M.; Geraldes, C. F. G. C.; Pubanz, D.; Merbach, A. E.: Conformational and Coordination Equilibria on DOTA Complexes of Lanthanide Metal Ions in Aqueous Solution Studied by ¹H-NMR Spectroscopy. *Inorganic chemistry* **1997**, *36*, 2059-2068.
- (11) Woods, M.; Aime, S.; Botta, M.; Howard, J. A. K.; Moloney, J. M.; Navet, M.; Parker, D.; Port, M.; Rousseaux, O.: Correlation of Water Exchange Rate with Isomeric Composition in Diastereoisomeric Gadolinium Complexes of Tetra(carboxyethyl)dota and Related Macrocyclic Ligands. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 9781-9792.
- (12) Dixon, W. T.; Ren, J.; Lubag, A. J.; Ratnakar, J.; Vinogradov, E.; Hancu, I.; Lenkinski, R. E.; Sherry, A. D.: A concentration-independent method to measure exchange rates in PARACEST agents. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* **2010**, *63*, 625-32.
- (13) Randtke, E. A.; Chen, L. Q.; Corrales, L. R.; Pagel, M. D.: The Hanes-Woolf linear QUESP method improves the measurements of fast chemical exchange rates with CEST MRI. *Magnetic Resonance in Medicine* **2014**, *71*, 1603-1612.
- (14) Liu, G.; Li, Y.; Pagel, M. D.: Design and characterization of a new irreversible responsive PARACEST MRI contrast agent that detects nitric oxide. *Magnetic Resonance in Medicine* **2007**, *58*, 1249-1256.

Chapitre 5

Complexes de lanthanide pour la
détection de l'urokinase et de la caspase-
3 : synthèse et caractérisation

Table des matières

5.1. Introduction.....	157
5.2. Synthèse des ligands.....	160
5.2.1. Synthèse des ligands L ₁ et L ₂	160
5.2.2. Synthèse des ligands L ₃ et L ₄	163
5.3. Détermination du nombre d'hydratation <i>q</i> et comparaison entre les complexes LnL₂, LnL₃, LnL₄ et LnL₁.....	172
5.4. Caractérisation des effets paraCEST	176
5.4.1. Propriétés paraCEST.....	176
5.5. Etudes enzymatiques.....	182
5.5.1. Suivi de la coupure enzymatique de GdL ₃ par l'urokinase	182
5.5.2. Suivi de la coupure enzymatique de GdL ₄ par la caspase-3.....	185
5.5.3. Bilan des coupures enzymatique	188
5.6. Conclusion.....	189
5.7. Références.....	190

5.1. Introduction

Le cancer entraîne une mauvaise régulation de l'activité enzymatique, qui peut même constituer un des premiers signes de la maladie au niveau cellulaire. Des réseaux protéolytiques sont particulièrement importants dans les processus comme l'angiogenèse, l'invasion tumorale et le développement des métastases [1]. Les protéases et leurs interactions constituent un réseau multidirectionnel, avec quelques enzymes clés comme les cathépsines, l'urokinase ou les matrix métallo-protéases (MMP). L'exploration de ces interactions protéolytiques par des techniques d'imagerie *in-vivo* pourrait permettre de mieux comprendre la biologie des tumeurs cancéreuses et par la suite de développer des approches thérapeutiques plus spécifiques et plus efficaces. D'importants efforts ont été dédiés à l'imagerie par résonance magnétique des MMPs, néanmoins, il reste difficile d'établir une cartographie précise des MMP car leur sélectivité est limitée et elles interagissent avec différents substrats [2,3].

Dans ce travail, notre objectif était de développer des sondes d'imagerie qui pourraient permettre de visualiser deux processus importants pour comprendre les tumeurs : la dispersion des cellules tumorales primaires (métastase) et la mort cellulaire programmée (apoptose). Dans ce but, nous voulions détecter deux protéases :

- (i) l'urokinase, indicateur de l'activité métastatique et marqueur des lésions précancéreuses [4] et
- (ii) la caspase, marqueur de l'apoptose [5], qui est activée en réponse à la chimiothérapie.

L'urokinase a été identifiée comme un biomarqueur de l'invasion tumorale et de l'activité métastatique et elle est associée à un mauvais pronostic dans différents cancers. C'est une enzyme clé dans les processus de métastase, mais plus récemment son rôle a été également évoqué dans l'établissement des tumeurs et dans l'angiogenèse. Malgré ce potentiel pour le diagnostic, la quantification de l'urokinase dans la clinique se fait uniquement sur les échantillons de tissu *ex-vivo* (biopsies). Dans la littérature, des exemples de détection de l'urokinase ont été reportés, mais la détection de son activité enzymatique reste limitée à l'imagerie optique.

Chapitre 5

Pendant et suite à un traitement, il est essentiel de suivre la réponse cellulaire qui doit se traduire par l'apoptose. La caspase-3 est un marqueur reconnue de l'apoptose et l'activité de la caspase-3 pourrait servir pour le suivi de la réponse aux agents chimiothérapeutiques. En IRM, deux exemples ont été reportés de la détection de l'activité enzymatique liée à l'apoptose [6].

Les travaux reportés dans ce chapitre décrivent la synthèse et la caractérisation de trois ligands (**L₂**, **L₃** et **L₄**) (**figure 5.1**) dont les complexes de lanthanides ont été étudiés respectivement pour la détection de l'activité enzymatique de la pénicilline amidase, de l'urokinase et de la caspase-3, par modulation de la relaxivité et/ou de l'effet paraCEST. Le ligand **L₂**, comportant le substrat de la pénicilline amidase, ne représentant pas d'intérêt biologique, a été étudié comme composé modèle. Le composé **L₃** possède sur sa structure chimique un enchaînement de 3 acides aminés (GGR), substrat spécifique de l'urokinase, et le ligand **L₄** possède sur sa structure chimique le peptide DEVD, substrat spécifique de la caspase-3.

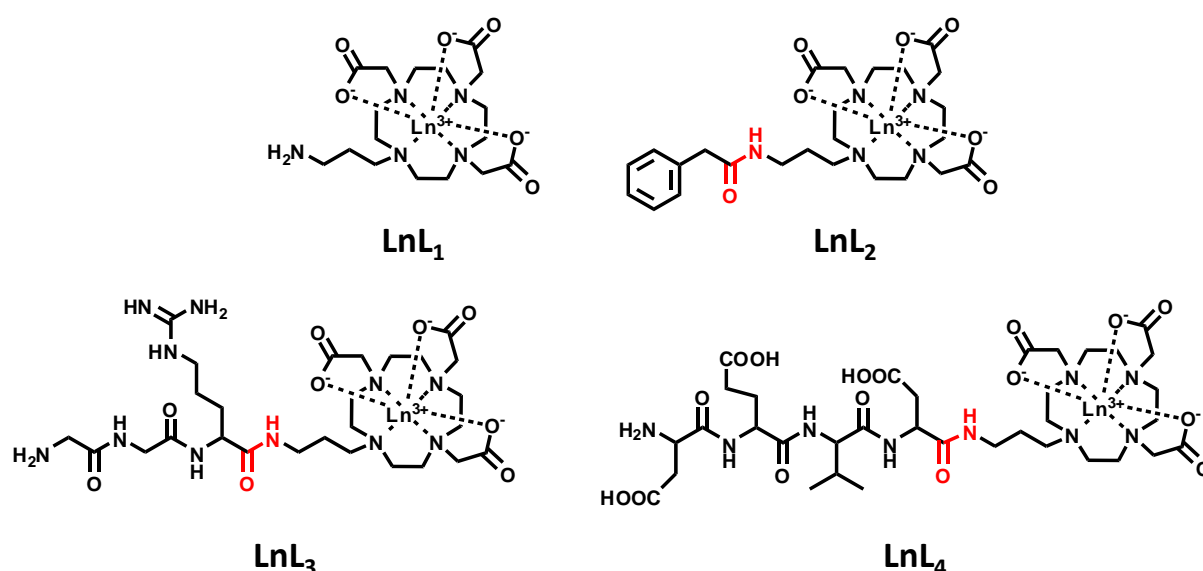


Figure 5.1 : Structure des composés discutés dans le texte, le site de coupure enzymatique est montré en rouge

Chacune des trois molécules (**L₂**, **L₃** et **L₄**) est conçue de sorte que l'action de l'enzyme spécifique conduise à la coupure du lien amide séparant le substrat de l'agent de contraste entraînant une modification des propriétés de relaxivité et/ou de paraCEST de leur complexe. Le résultat de l'action de l'enzyme sur les composés (**L₂**, **L₃** et **L₄**) est supposé donner lieu à la formation du composé **L₁** qui a également été synthétisé et étudié comme composé dont le complexe modélise l'état de l'agent de contraste après coupure enzymatique.

Complexes de Ln³⁺ pour la détection de l'urokinase et de la caspase-3

Un espaceur propyl a été choisi pour relier le substrat et le chélateur du lanthanide dans ces molécules. Ce choix a été fait en se basant sur les travaux de Congreve *et al.* [7]. En effet, ces auteurs ont précédemment montré la coordination de l'amide dans un complexe macrocyclique dérivé de Ln-DO3A où un espaceur propyl reliait un azote du macrocycle à une fonction picolylamide. Les auteurs ont trouvé un nombre d'hydratation de $q=0$ pour le complexe de Gd³⁺ et une relaxivité au-dessous de 3 mM⁻¹.s⁻¹.

De façon assez inattendue, lorsque l'espaceur était de type éthyle-, l'amide restait toujours coordonné, mais cette fois-ci le nombre d'hydratation était $q=1$ et la relaxivité observée était de l'ordre de 4 mM⁻¹.s⁻¹ (20MHz, 298K, pH6) (**figure 5.2**). Notre hypothèse était donc de dire qu'avant la coupure enzymatique, la relaxivité correspondra à celle d'un complexe non-hydraté, alors qu'après coupure enzymatique, elle sera celle d'un complexe bishydraté. Nos sondes enzymatiques pourraient par conséquent fonctionner comme des « switches off/on » ce qui est toujours avantageux en IRM car l'intensité augmente avec l'avancement de la coupure enzymatique. En plus d'une détection en T₁ avec les complexes de Gd³⁺, la présence des protons échangeables sur la fonction latérale pourrait également permettre une détection en CEST en utilisant d'autres lanthanides.

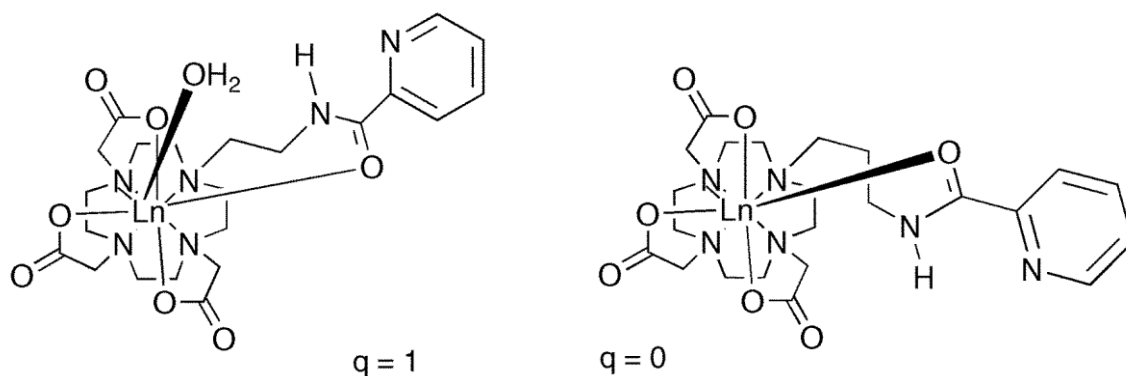


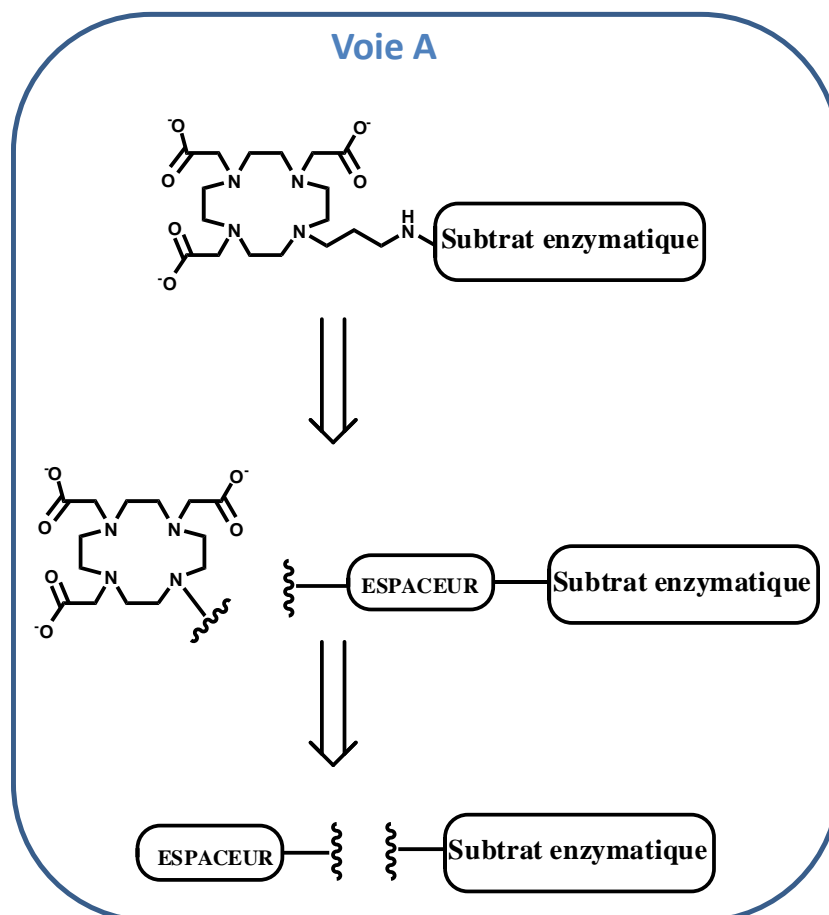
Figure 5.2 : Structure des composés étudiés par Congreve *et al.* [7], ayant motivé le choix de l'espaceur utilisé dans la conception des molécules de ce chapitre.

5.2. Synthèse des ligands

Les ligands **L2**, **L3** et **L4** sont tous trois construits selon le même principe : une unité chélatante de type polyamine macrocyclique DO3A pour les ions lanthanides est reliée au substrat de l'enzyme cible par le biais d'un espaceur propylamine. Ce premier paragraphe décrit les stratégies de synthèses employées pour la conception des différents ligands.

5.2.1. Synthèse des ligands **L1** et **L2**

La synthèse de ligands macrocycliques de type DO3A comportant un espaceur propylamine est déjà largement décrite dans la littérature [7-12]. Deux voies de synthèses sont principalement représentées (**figure 5.3**). Dans la première voie de synthèse (A), l'alkylation sur le macrocycle de l'espaceur couplé au substituant apparaît en fin de synthèse. Dans la deuxième voie de synthèse (B), l'alkylation de l'espaceur apparaît en début de synthèse et le substituant est introduit ensuite.



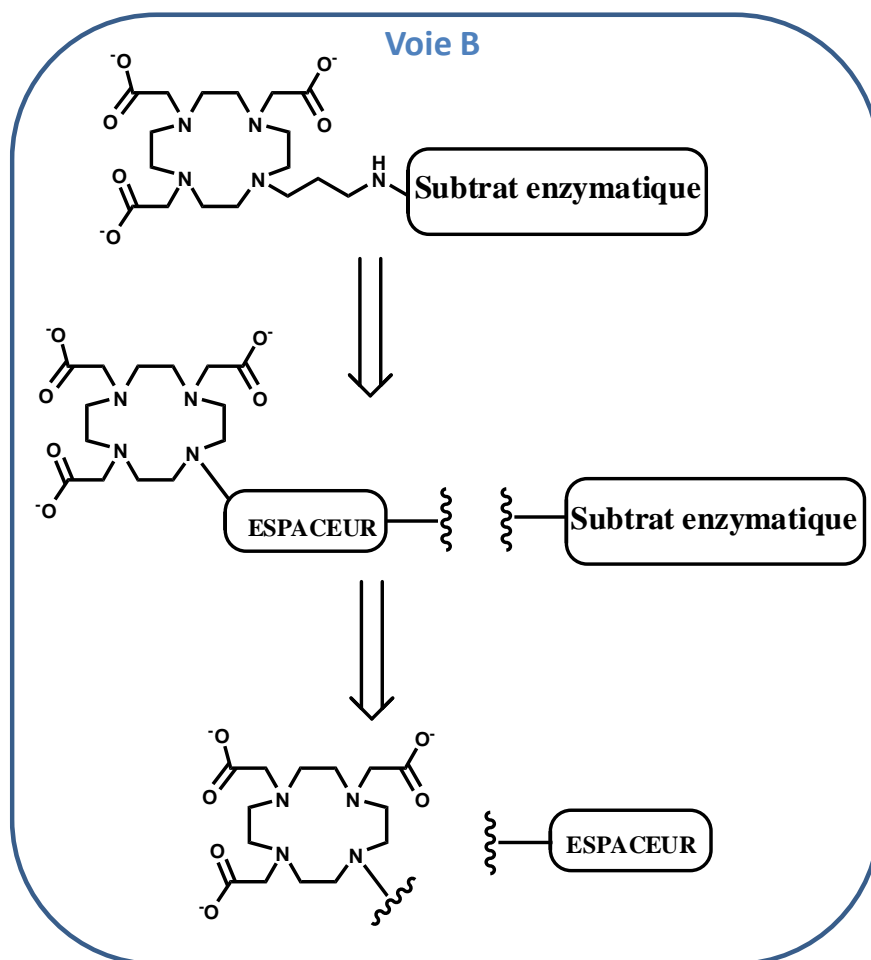


Figure 5.3 : Description des différentes voies de synthèses envisagées pour la synthèse de L_2

La voie de synthèse A n'a pas été choisie pour effectuer la synthèse du ligand L_2 . Cette voie de synthèse correspond à l'alkylation de l'entité *N*-(3-halogenopropyl)- benzeneacétamide sur le macrocycle protégé DO3A*t*Bu, cependant les composés de type *N*-(3-halogenopropyl) amide sont décrits pour subir une autocyclo-O-alkylation intramoléculaire. En effet, il a été montré que la cyclisation du *N*-(3-halogenopropyl)- benzeneacétamide a lieu de manière spontanée dans le chloroforme pour donner l'oxazine correspondante avec un rendement de 53% (**figure 5.4**) [13].

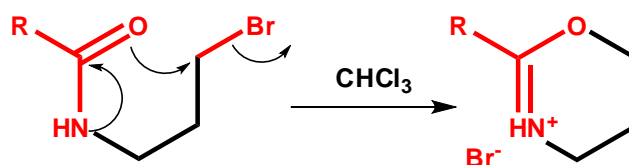


Figure 5.4 : Mécanisme de formation d'une oxazine [13]

Chapitre 5

Afin d'éviter la cyclisation de l'espaceur, la seconde stratégie de synthèse (B) est alors envisagée (**figure 5.5**).

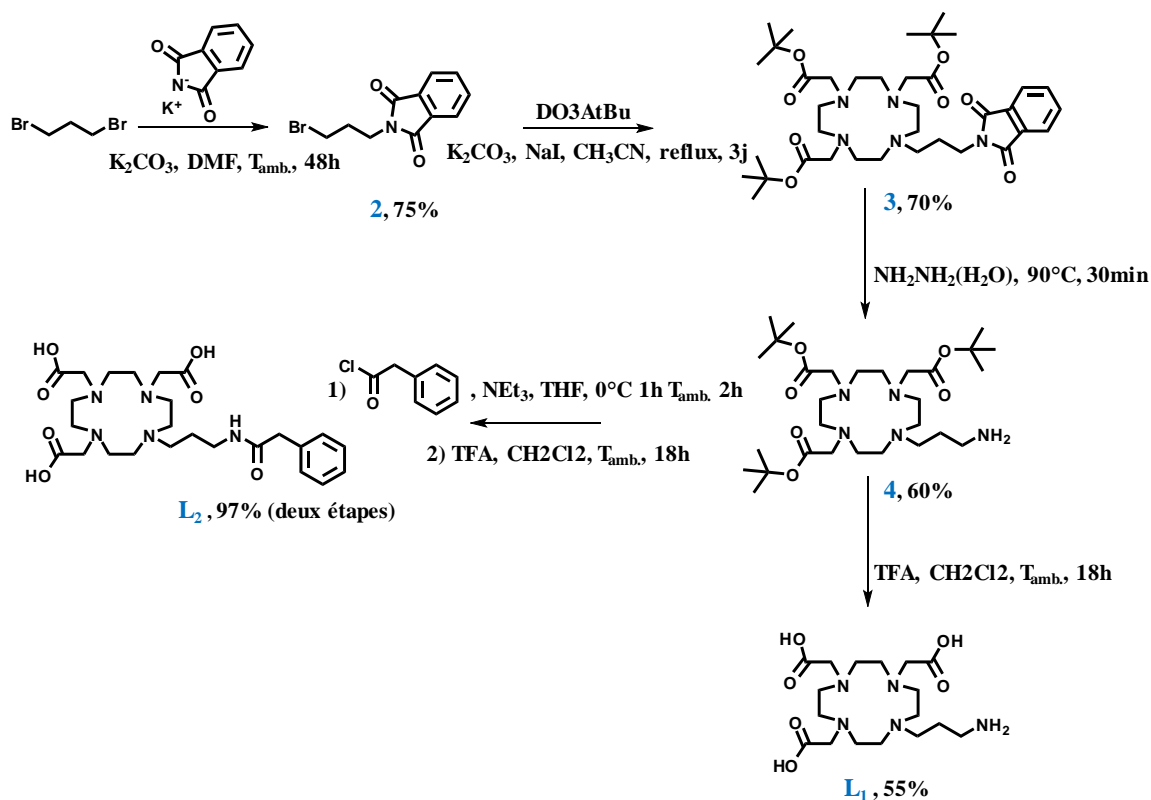


Figure 5.5 : Description de la synthèse de **L**₁ et **L**₂

Dans cette stratégie de synthèse, l'espaceur propylamine est dans un premier temps alkylé sur le macrocycle, le substrat de la pénicilline amidase (le chlorure de benzène acétylé) est ajouté dans un second temps.

Le composé **2** est obtenu par réaction de Gabriel de l'ion phthalimide sur l'halogénure d'alkyle commercial 1,3-dibromopropane avec un rendement de 75%. La *N*-alkylation du dérivé bromé **2** sur le macrocycle commercial DO3AtBu donne le composé **3**, dont l'amine terminale est déprotégée par réaction de l'hydrate d'hydrazine sur le phthalimide, pour donner le composé **4** à partir duquel les ligands **L**₁ et **L**₂ ont pu être synthétisés. La déprotection des groupements acides carboxyliques par l'acide trifluoroacétique (TFA) permet d'obtenir le ligand **L**₁ avec un rendement après recristallisation de 55%, similaire au rendement déjà reporté dans la littérature (59%) [10] (**figure 5.5**). Le ligand **L**₁ est ainsi obtenu en 4 étapes avec un rendement global de 17%.

Le ligand **L2** est obtenu en deux étapes à partir du composé **4**. Dans un premier temps, la fonction amine primaire du composé **4** réagit avec le chlorure de benzoyle pour former l'amide correspondant.

Dans une deuxième étape, les esters de *tert*-butyles du macrocycle sont éliminés en milieu acide (TFA) de manière quantitative. Le ligand **L2** est ainsi obtenu en 5 étapes avec un rendement global de 31%.

5.2.2. Synthèse des ligands **L3** et **L4**

5.2.2.1. Synthèse des ligands **L3** et **L4** sur support solide

Ce paragraphe décrit la synthèse sur support solide des composés **L3** et **L4** comportant un enchaînement de 3 acides aminés (GGR : Gly-Gly-Arg) et 4 acides aminés (DEVD : Asp-Glu-Val-Asp) respectivement.

La synthèse sur support solide est la méthode de synthèse la plus communément employée dans le cadre de la synthèse peptidique. Cette méthode permet de s'affranchir des étapes de purifications entre chaque ajout d'acides aminés, de simples lavages suffisent à éliminer l'excès de réactif et les sous-produits formés restés en solution. Dans le cas présenté ici, cette méthode de synthèse permet la construction du peptide directement à partir du dérivé macrocycle DO3A*t*Bu.

La synthèse sur support solide de ligands similaires à **L3** et **L4**, comportant les enchaînements peptidiques DEVD ou GGR a précédemment été reportée par Pagel *et al.* [14,15]. Ces auteurs proposent d'introduire une des fonctions acide carboxylique du macrocycle DO3A non protégée sur la résine, méthode qui ne permet pas la vérification de l'efficacité de la réaction. Afin de permettre le contrôle du couplage du macrocycle sur la résine, nous proposons de lier la résine polystyrène à l'amine libre du composé **4** précédemment synthétisé, par le biais de l'espaceur BAL ((5-(4-Formyl-3,5-diméthoxyphénoxy) valérique). L'avantage d'un tel espaceur est qu'il comporte les caractéristiques d'un groupe protecteur éliminable dans des conditions acides (TFA), tout en permettant un couplage facile au support solide [16]. Le couplage du composé **4** sur l'espaceur BAL a été réalisé par amination réductrice en présence de cyanoborohydrure de sodium (NaBH₃CN) (figure 5.6). Un test à la DNPH (2,4-dinitrophénylhydrazone) permet la vérification du couplage du composé **4** sur l'espaceur BAL [17].

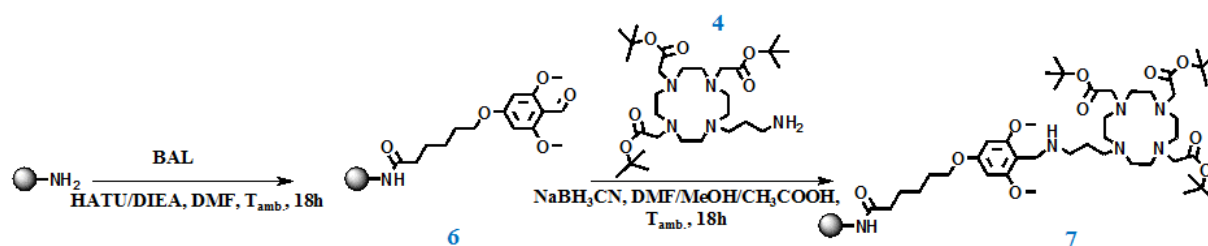


Figure 5.6: Couplage de la résine sur l'espaceur BAL et amination réductrice pour former **7**

L'élongation du peptide GGR sur le composé **7** a été réalisée selon la stratégie standard de couplage peptidique, ainsi que les groupements protecteurs utilisés sont les mêmes que pour l'approche de synthèse en solution.

Différents agents d'activation ont été utilisés afin de déterminer les conditions permettant d'obtenir le meilleur rendement tout en limitant la formation d'épimères. Parmi les agents de couplage testés, l'HATU (1-[Bis(diméthylamino)méthylène]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate), possède des taux d'épimérisation faibles (<1%) en comparaison à d'autres agents d'activation [18]. De plus, l'HATU présente les meilleurs taux de couplage par rapport à son analogue l'HCTU (2-(6-Chloro-1-H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthylaminiium hexafluorophosphate). La synthèse du composé **8a** a ainsi été effectuée en 5 étapes à partir du composé **7**, l'agent d'activation HATU a été utilisé en présence de DIEA (*N,N*-diisopropyléthylamine). Le peptide DEVD du composé **8b** comporte deux acides aspartiques susceptibles de former des résidus aspartamides en milieu basique, ce qui rend sa synthèse plus délicate. Les résidus aspartamides proviennent de la formation d'un cycle entre l'azote du groupement α -carboxyl amine et la fonction β -carboxyl de la chaîne latérale. Il est préférable que la formation d'aspartamide soit évitée puisque elle favorise l'épimérisation et entraîne la formation de différents sous-produits possédant la même masse que le produit cible [19]. La réaction de l'aspartamide avec l'eau entraîne la formation de peptides D/L- α -aspartyle et D/L- β -aspartyle, de mêmes masses molaires que le peptide cible. De plus, l'ouverture du cycle par la pipéridine donne un mélange de D/L- α -pipéridine et D/L- β -pipéridine caractérisable par spectrométrie de masse (**figure 5.7**). Eviter les réactions en milieu basique permet de limiter la formation des groupements aspartamides. Ainsi, le temps de déprotection des résidus Fmoc dans la pipéridine a été réduit et l'activation par l'Oxyma Pure/DIC (*N,N*-diisopropylcarbodiimide) ne nécessitant pas l'emploi de base a été utilisée (**figure 5.8**).

Complexes de Ln³⁺ pour la détection de l'urokinase et de la caspase-3

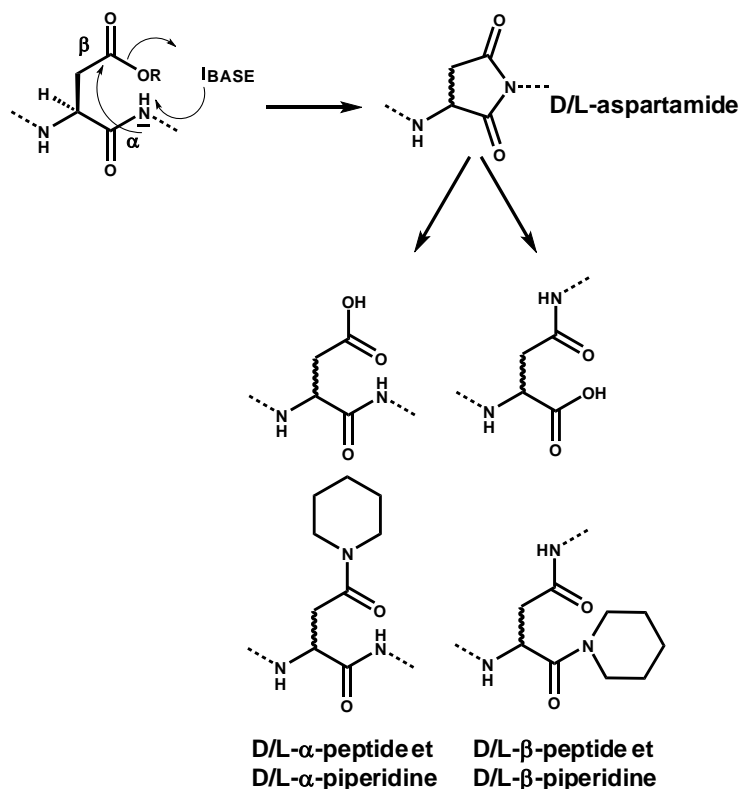


Figure 5.7: Formation des résidus aspartamide [19]

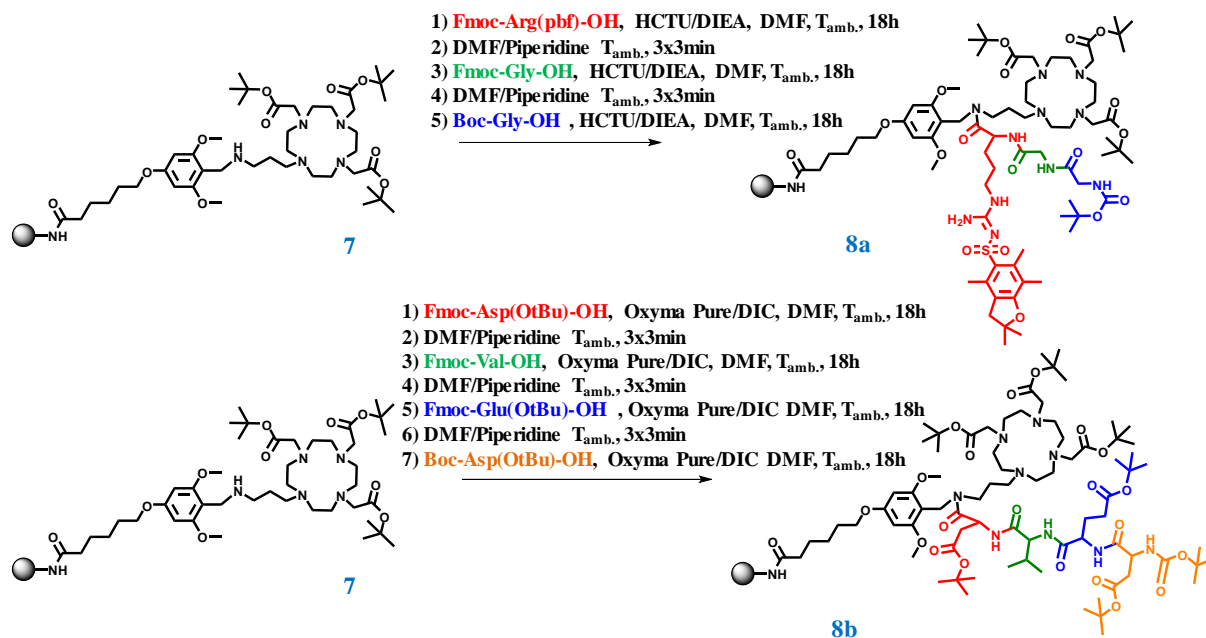


Figure 5.8 : Elongation des peptides RGG et DEVD sur support solide

Chapitre 5

La libération du peptide du support solide, ainsi que la déprotection des acides carboxyliques du macrocycle, des chaînes latérales et de la fonction *N*-terminale du dernier acide aminé, sont réalisés en une seule étape dans le TFA en présence d'un piègeur de carbocation, le triisopropylsilane (TIPS) (**figure 5.9**). La présence de piègeur de carbocation lors de la déprotection finale du peptide permet la neutralisation de cations réactifs formés lors de la réaction. En effet, après déprotection des chaînes latérales du peptide, certains groupements protecteurs (tels que les groupements protecteurs de l'arginine) peuvent être extrêmement réactifs et doivent être capturés pour éviter un rattachement ou une modification du peptide déprotégé. Les ligands **L3** et **L4** sont ainsi obtenus avec un rendement de 80% et 76% sur un total de 8 et 10 étapes respectivement, rendements comparables à ceux obtenus par Pagel *et al.* (85-88%) [14,15].

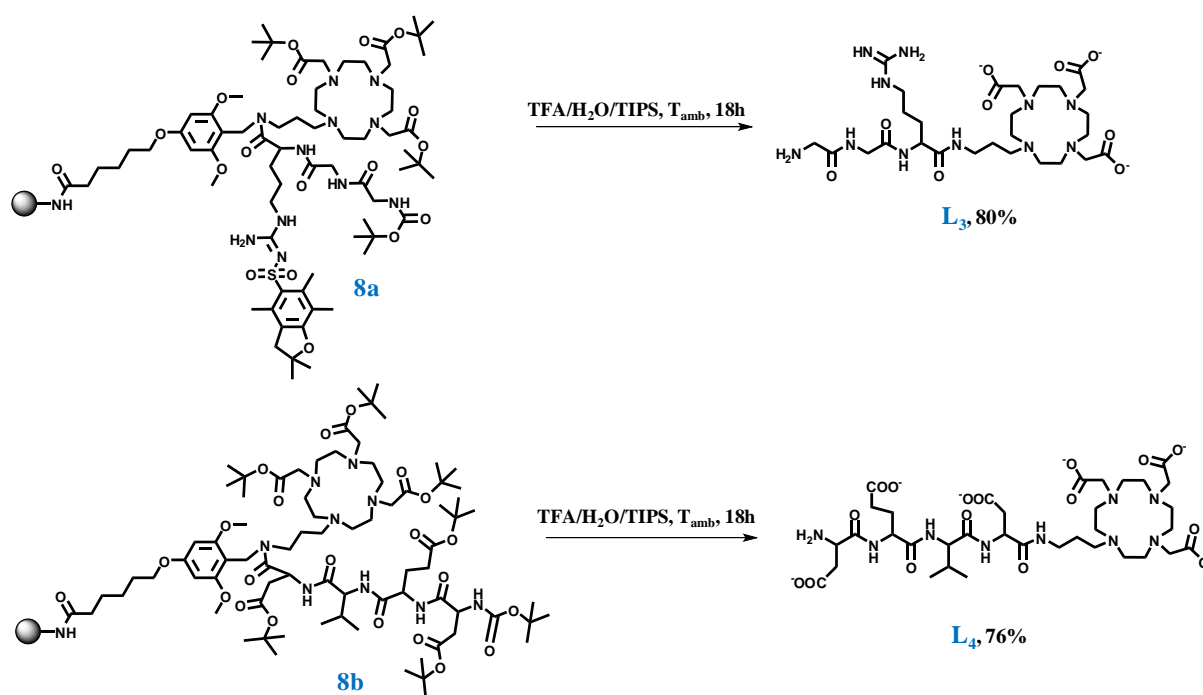


Figure 5.9 : Libération des molécules de la résine et déprotection des chaînes latérales

5.2.2.2. Synthèse du ligand L₃ en solution

Une deuxième approche de synthèse envisageable pour la synthèse de petits peptides tels que pour les composés L₃ et L₄, est la synthèse en solution. Cette deuxième stratégie, réalisée en parallèle de la synthèse sur support solide, peut s'avérer avantageuse puisqu'elle permet de produire facilement de petits peptides à l'échelle du gramme. La synthèse de L₃ qui est constitué d'un enchaînement de trois acides aminés a été entreprise suivant la méthode de synthèse en solution décrite dans *Nature Protocols* par Peterson *et al.* [20]. Cette méthode propose l'élongation du peptide DEVD à partir du chromophore *para*-nitro aniline. Nous avons adapté cette méthode pour la synthèse du peptide GGR à partir de l'espaceur 3-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)propan-1-amine (noté **9**), en vue de sa fixation sur le dérivé macrocyclique protégé DO3A*t*Bu. La fonction alcool du composé commercial 3-aminopropanol est protégée de manière spécifique par un éther silylé (*tert*-butylchlorodiphenylsilane) pour donner le composé **9** avec un rendement de 48% (**figure 5.10**).

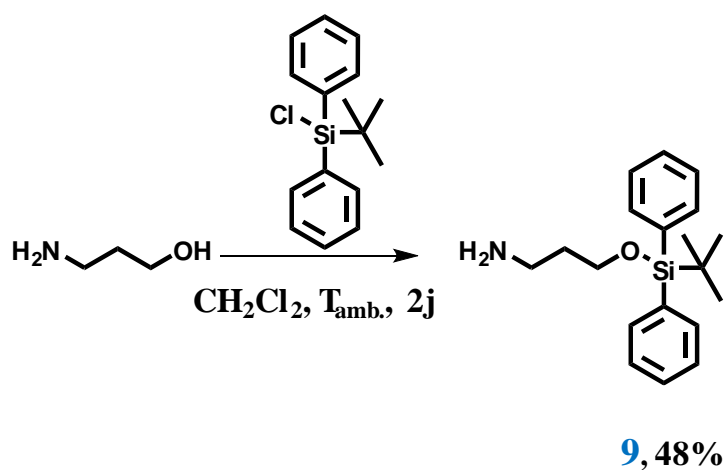


Figure 5.10 : Protection de l'alcool primaire.

Chapitre 5

Deux stratégies de synthèse Boc (*tert*-butoxycarbonyl) et Fmoc (Fluorénylméthoxycarbonyl) peuvent être employées pour la synthèse peptidique. L'élargissement du peptide GGR a été réalisé du C- vers le N-terminal par la méthode Fmoc. Le sens de la synthèse peptidique (C->N) est imposé par la nécessité d'activer la fonction acide au détriment de la fonction amine, afin de minimiser les risques d'épimérisation lors du couplage de chaque acide aminé. Les acides aminés utilisés sont protégés par une fonction Fmoc sur l'amine à l'exception de la dernière glycine qui est protégée par un groupement Boc, les chaînes latérales sont protégées par des groupements éliminables en milieu acide. Les couplages des acides aminés ont été réalisés par l'utilisation de l'agent d'activation PyBop ((Benzotriazol-1-yloxy) tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate) et de la base DIEA (*N,N*-Diisopropyléthylamine) dans le dichlorométhane et les déprotections des groupements protecteurs Fmoc ont été effectuées par la base TAEA (tris(2-aminoéthyl)amine).

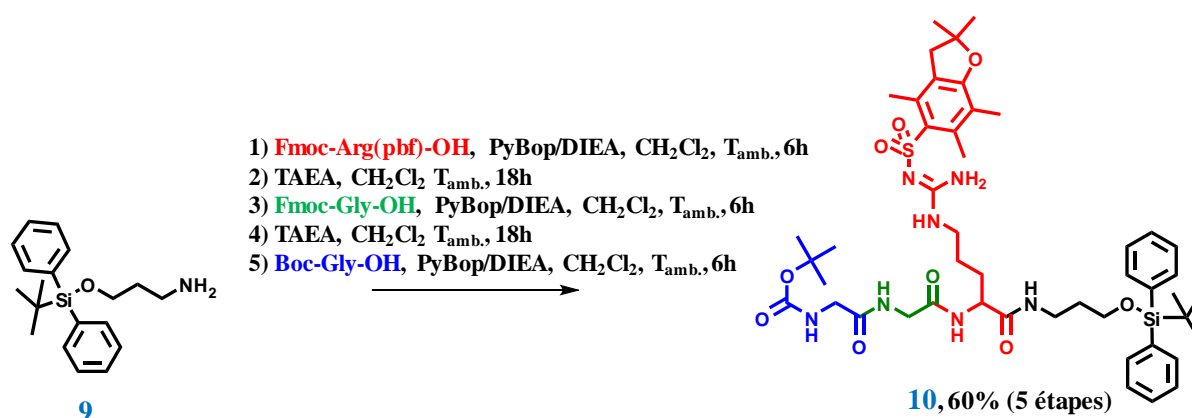


Figure 5.11 : Elongation du peptide RGG sur le composé **9**

Le composé **10** a été obtenu en cinq étapes à partir du composé **9** avec un rendement global de 60% (**figure 5.11**). Contrairement à la méthode décrite par Peterson *et al.* [20], une purification sur colonne de silice par chromatographie Flash a été réalisée après chaque étape de couplage d'acide aminés afin d'éviter la formation de peptides tronqués.

Complexes de Ln³⁺ pour la détection de l'urokinase et de la caspase-3

Afin d'envisager l'alkylation du peptide par le macrocycle, la présence d'un groupement nucléofuge est nécessaire pour permettre la réaction de substitution nucléophile. Pour cela, la fonction alcool du composé **10**, a dans un premier temps, été déprotégée en présence de fluorure de tétra-*n*-butylammonium (TBAF) pour donner le composé **11** (figure 5.13). Différents nucléofuges peuvent être utilisés, nous avons concentré notre attention sur la synthèse des composés chlorés, bromés (**12**) et mésylés (**13**). La chloration du composé **10** réalisée en présence de 2 équivalents de chlorure de thionyle et 5 équivalents de pyridine n'a pas permis d'obtenir le dérivé souhaité mais le sulfite correspondant a été mis en évidence par spectrométrie RMN et HRMS (figure 5.12).

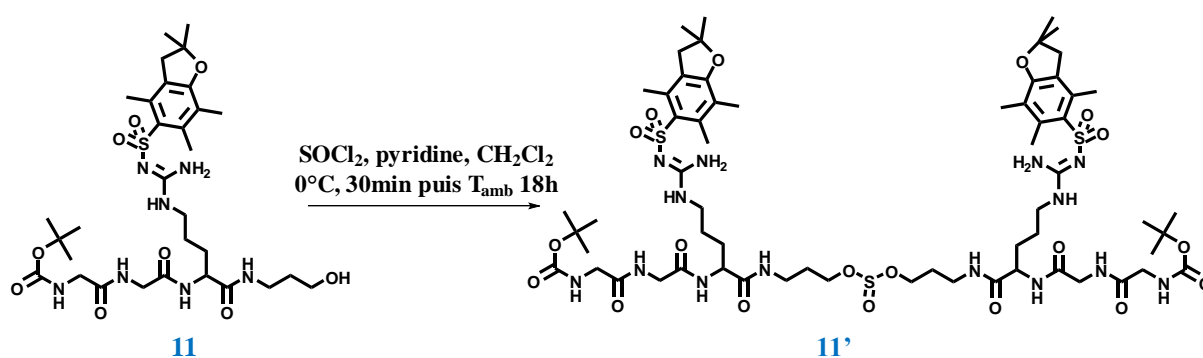


Figure 5.12 : réaction secondaire, formation d'un sulfite

Les groupements protecteurs des acides aminés du composé **11** sont acido-labiles, l'excès de pyridine permet d'éviter l'acidification du milieu réactionnel et donc la déprotection de ces groupements. Cet excès entraîne également la formation de chlorure de pyridinium, inhibant alors la réaction de chloration au profit de la substitution nucléophile de l'alcool du composé **11** par l'intermédiaire chlorure de sulfonyle. Seul le sulfite ainsi formé est alors observé (figure 5.12).

Bien que le produit de chloration n'ait pas été observé, la réaction de l'alcool **11** sur le chlorure de méthane sulfonyle a permis d'obtenir le dérivé mésylé correspondant avec un rendement de 65%. Le composé bromé **12** a également été obtenu avec un rendement de 40% par réaction de la triphénylphosphine et du *N*-bromosuccinimide sur l'alcool **11** (figure 5.13).

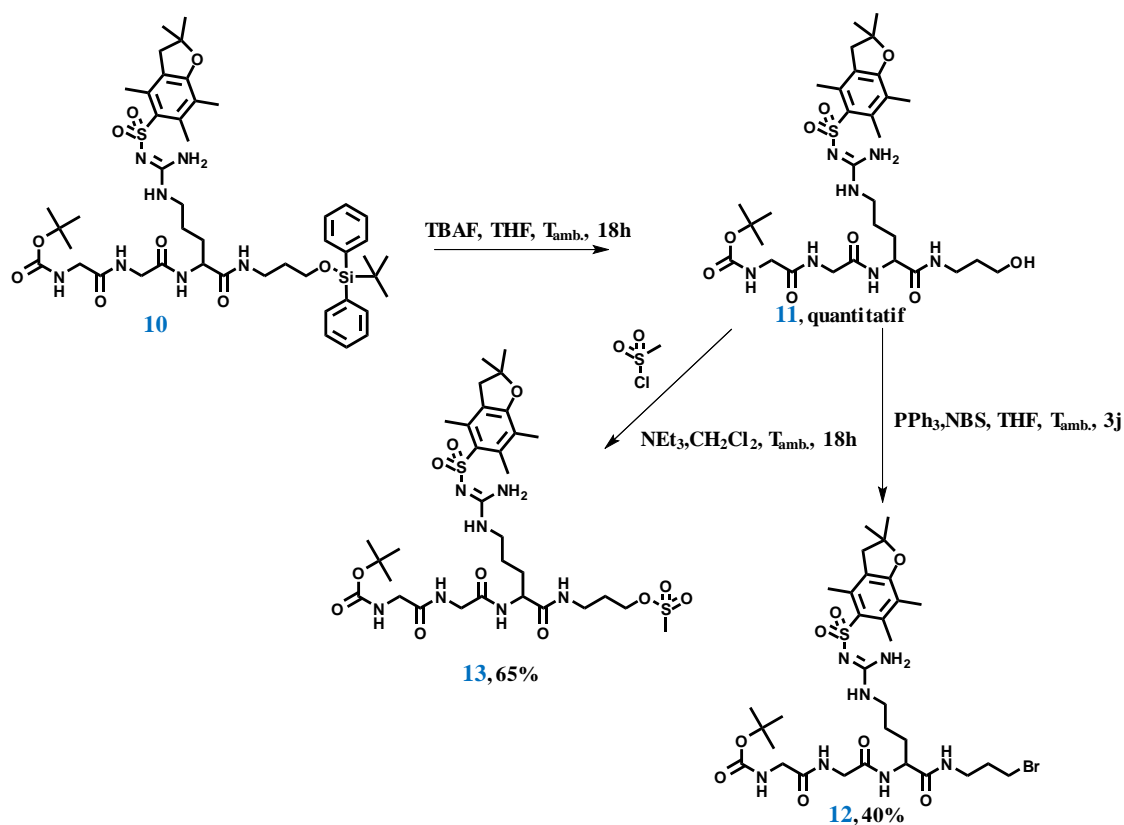


Figure 5.13 : Description de la synthèse des composés 10, 11 et 12

Dans le but de synthétiser le ligand **L3** à l'échelle du gramme, de grandes quantités de DO3A*t*Bu (utilisé en excès) sont nécessaires. Le DO3A*t*Bu utilisé a été synthétisé au laboratoire à partir du cyclène, suivant le protocole décrit par Axelsson *et al.* [21].

Les réactions d'alkylation des composés **12** et **13** sur le macrocycle DO3A*t*Bu ont été réalisées dans les conditions standards K₂CO₃/CH₃CN, reflux.

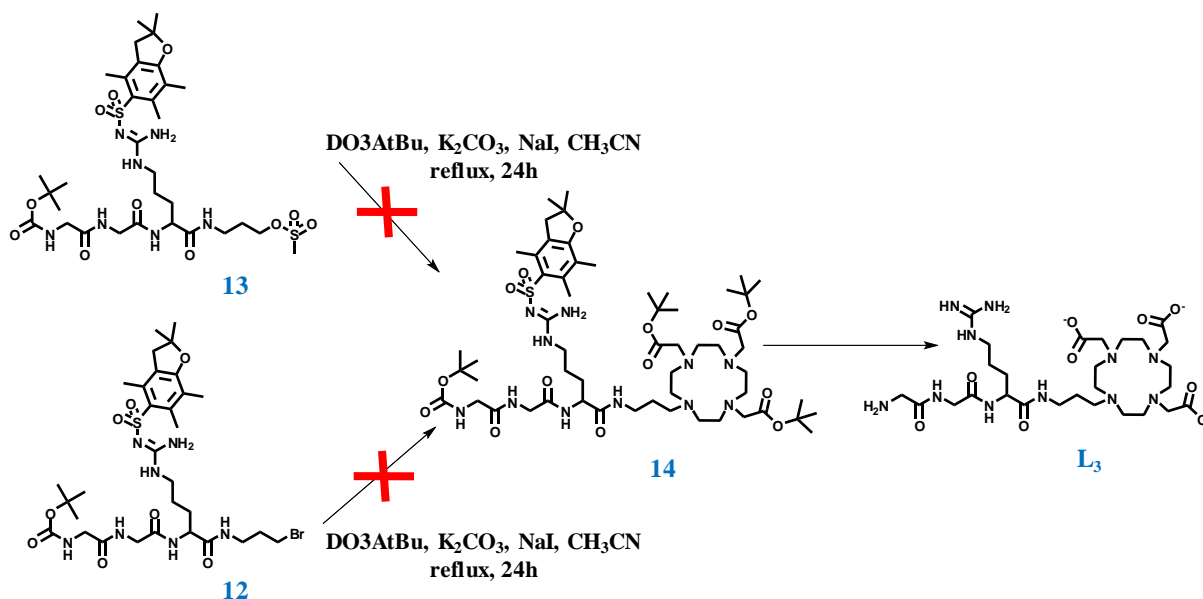


Figure 5.14 : Description de la réaction d'alkylation du DO3AtBu sur les composés **12** et **13**

Aucun des deux précurseurs **12** ou **13** n'a permis d'obtenir le composé **14** (**figure 5.14**). En effet, les analyses HRMS et ¹H RMN ont montré l'hydrolyse des composés bromés (**12**) et mésylés (**13**) en solution lors de la réaction de ceux-ci avec le macrocycle. Lors de ces réactions, des conditions anhydres strictes n'ont pas pu être obtenues. En effet, le DO3AtBu synthétisé est hygroscopique, la présence d'eau a été vérifiée par spectroscopie ¹H RMN, même après lyophilisation du composé. Les peptides **12** et **13** présentent également une forte capacité à capter les molécules d'eau atmosphériques. L'ajout de tamis moléculaire n'a pas permis d'obtenir des conditions anhydres suffisantes pour éviter l'hydrolyse des composés **12** et **13**. De plus, la formation *in-situ* du dérivé iodé peut également favoriser l'hydrolyse observée. Ainsi, la tentative de synthèse en solution du ligand **L₃** s'est avérée infructueuse, les conditions de la réaction d'activation doivent encore être améliorées.

5.3. Détermination du nombre d'hydratation q et comparaison entre les complexes LnL_2 , LnL_3 , LnL_4 et LnL_1

L'étude des profils de Dispersion de la Relaxation Magnétique Nucléaire du proton (^1H NMRD) est une des techniques permettant de déterminer les paramètres qui influencent la relaxivité des complexes de Gd^{3+} [22]. En particulier, la relaxivité est linéairement proportionnelle au nombre de molécules d'eau coordonnées à l'ion métallique et donc les valeurs de relaxivité nous permettent une estimation du nombre d'hydratation.

Les profils NMRD de GdL_1 et GdL_2 montrant la dépendance de la relaxivité de ces complexes au champ magnétique ont été mesurés à 25°C, 37°C et 50°C. Les profils NMRD à 50°C n'ont pas été mesurés pour les complexes GdL_3 et GdL_4 afin d'éviter la dégradation des peptides par la température. Les mesures ont été effectuées pour des champs magnétiques compris entre 0.01 et 400MHz (**figure 5.15**).

Tous les complexes GdL_1 , GdL_2 , GdL_3 et GdL_4 montrent la même dépendance de la relaxivité avec la température, r_1 diminue lorsque la température augmente quelque soit la fréquence de Larmor (**Figure 5.15**). Ces résultats sont en accord avec ce qui est observé pour les molécules de faible poids moléculaire et témoigne de l'absence d'agrégation des complexes.

Tableau 5.1 : Valeurs de relaxivité des complexes de Gd^{3+} mesurées à pH7.4, 25°C et 20MHz

	r_1 ($\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$)
GdL₁	8.26
GdL₂	4.01
GdL₃	3.27
GdL₄	3.65

Complexes de Ln³⁺ pour la détection de l'urokinase et de la caspase-3

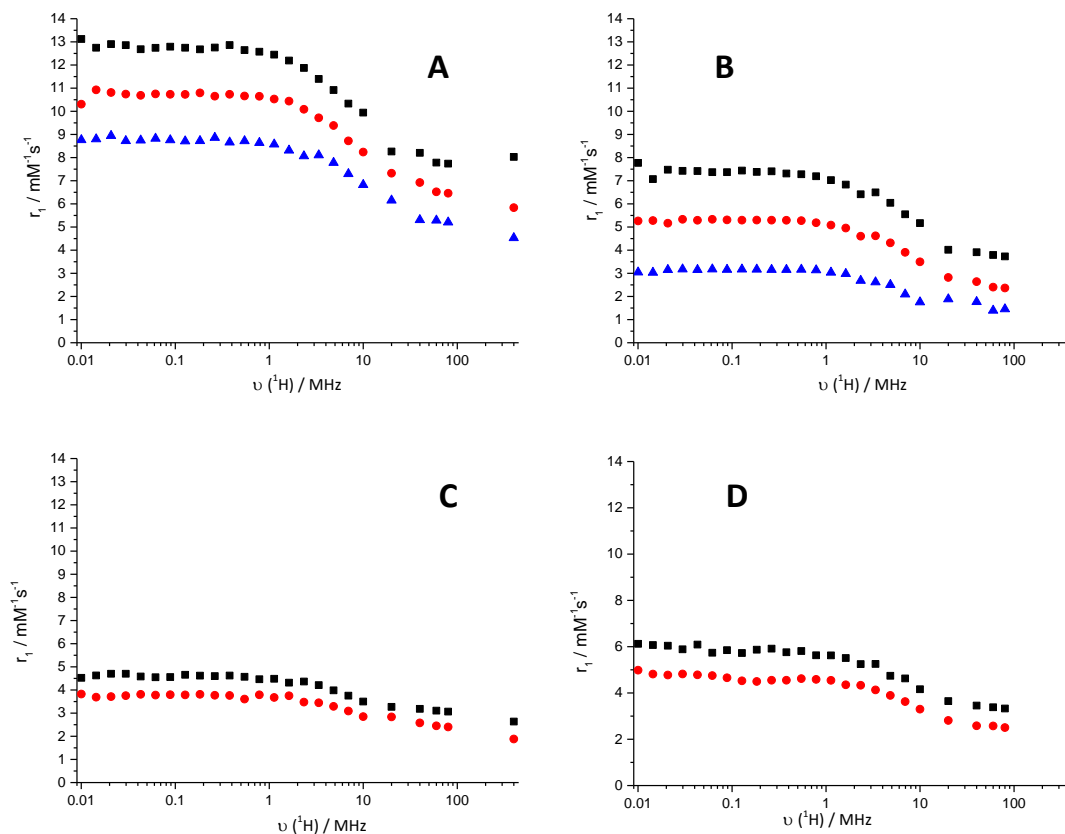


Figure 5.15: Relaxivité du proton, r_1 , en fonction de, la fréquence de Larmor à différentes températures, 25°C (■), 37°C (●) et 50°C (▲) pour **GdL₁** (A), **GdL₂** (B), **GdL₃** (C) et **GdL₄** (D)

La comparaison entre les complexes modélisant l'état avant coupure enzymatique (**GdL₂**, **GdL₃** et **GdL₄**) et après coupure enzymatique (**GdL₁**) montre une augmentation de la relaxivité de l'ordre de 51% pour **GdL₂**, 60% pour **GdL₃** et 56% pour **GdL₄** (à 20mHz, 25°C pH7.4) (**tableau 5.1**). Ces changements significatifs de la relaxivité peuvent être expliqués par une modification du nombre d'hydratation des complexes entre l'état avant (**GdL₂**, **GdL₃** et **GdL₄**) et après coupure enzymatique (**GdL₁**). Les valeurs de relaxivité mesurés dans ces conditions pour **GdL₁** sont identiques aux valeurs obtenues en milieu tamponé.

Afin de vérifier cette supposition, le nombre de molécules d'eau coordonnées sur le centre métallique (q) a été déterminé en mesurant le temps de décroissance des états excités de luminescence des analogues d'Eu³⁺ formés avec les ligands **L₁**, **L₂**, **L₃** et **L₄**. Ces mesures sont réalisées par excitation directe sur le lanthanide à $\lambda_{ex}=396\text{nm}$ du fait de l'absence de chromophores sur les complexes. Les mesures de temps de vie de luminescence ainsi que les valeurs de q obtenues sont reportées dans le **tableau 5.2**.

Tableau 5.2 : Temps de vie de luminescence et nombre de molécules d'eau coordinées

	τ_{H_2O} (ms)	τ_{D_2O} (ms)	q^a
EuL₁	0.422	1.538	1.7±0.2
EuL₂	0.506	1.431	1.2±0.2
EuL₃	0.638	1.716	0.8±0.2
EuL₄	0.925	1.643	0.3±0.2

Résultats obtenues pour $\lambda_{ex}=396\text{nm}$, $\lambda_{em}=616\text{nm}$, 25°C , $\text{pH/pD}=7.4$. a : valeurs de q calculées à partir de la formule d'Horrocks corrigée, référence [23]

De manière non surprenante, le complexe **EuL₁** est celui qui possède le plus grand nombre de molécules d'eau coordinées au centre métallique. En effet, la structure chimique laisse supposer que le métal est heptacoordiné laissant place à deux sites de coordination pour les molécules d'eau. Ce grand nombre d'hydratation est en accord avec la relaxivité élevée qui a été observée pour le complexe de Gd^{3+} .

Le complexe **EuL₂** comporte une molécule d'eau, ce qui est en accord avec les valeurs de relaxivité observées pour l'analogue Gd^{3+} . Ces résultats suggèrent que le métal est octacoordiné par le ligand, et que l'amide est lié au centre métallique. La coordination du groupement amide sur un espaceur a été en effet reportée par Congreve *et al.* [7] mais ces auteurs, contrairement à nos résultats, ont observé $q = 0$ pour ce type de complexe. Ces nombres d'hydratation différents mesurés pour les complexes dont la structure est très similaire montrent que l'état d'hydratation reste un paramètre difficile à prévoir.

La situation est similaire pour **LnL₃**. Les valeurs de relaxivité obtenues pour le complexe **GdL₃**, sont en accord avec la présence d'une molécule d'eau coordinée au centre métallique, confirmée par mesure des temps de demi-vies de luminescence du complexe **EuL₃**.

En revanche, le nombre d'hydratation est $q \approx 0$ pour **EuL₄**. Ce résultat suggère, en plus de la coordination de la fonction amide, la coordination d'une des fonctions carboxylates des chaînes latérales du peptide sur le métal provenant très probablement d'un acide aspartique (**figure 5.16**).

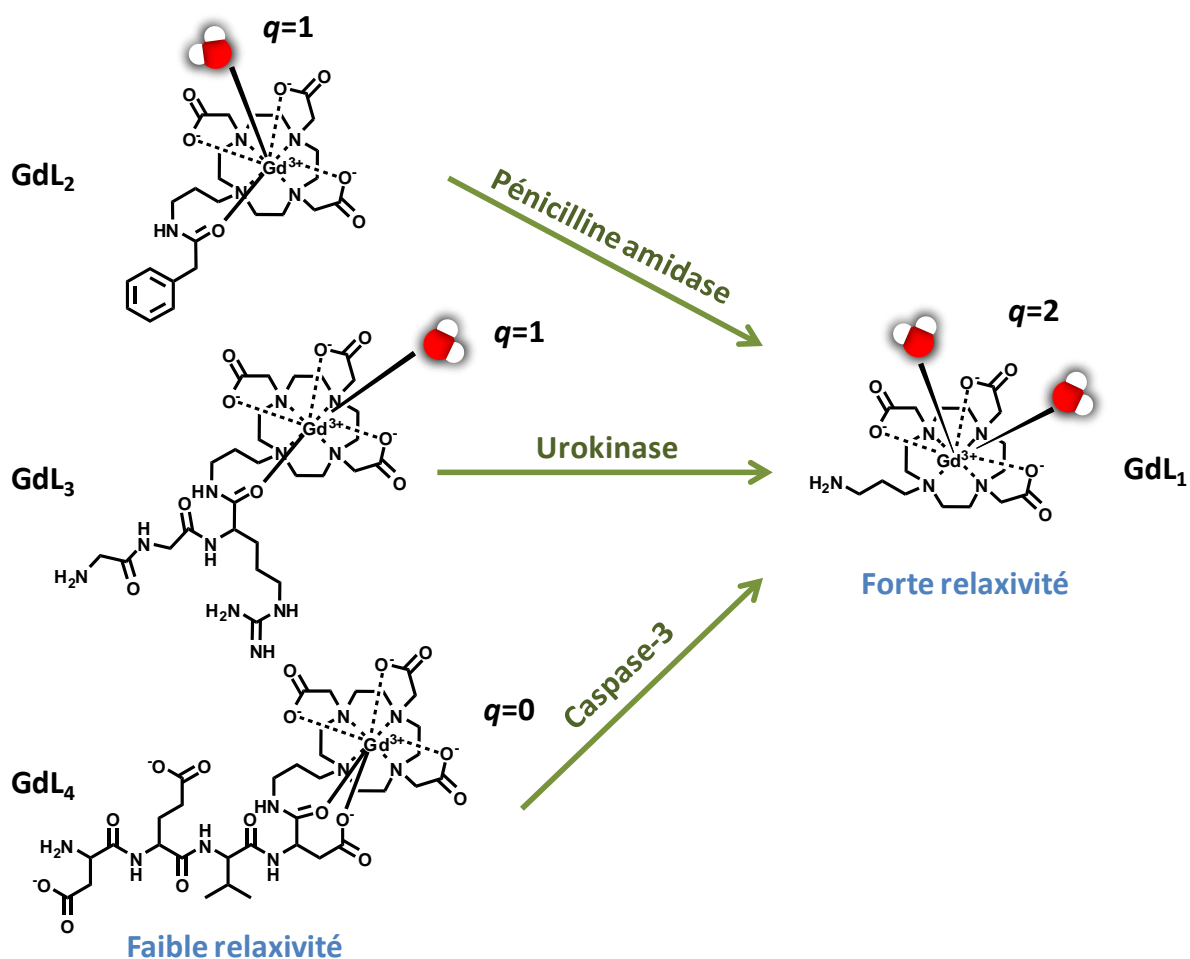


Figure 5.16 : Schéma récapitulatif de l'état d'hydratation de chaque complexe (**GdL₂**, **GdL₃** et **GdL₄**) avant coupure enzymatique, et représentation de l'état attendu après réaction enzymatique (**GdL₁**).

Malgré un nombre d'hydratation proche de zéro, la relaxivité de **GdL₄** est supérieure à celle de **GdL₃** qui possède pourtant un nombre d'hydratation plus élevé ($q \approx 1$). Cette différence de relaxivité entre ces deux complexes peut s'expliquer avant tout par la présence d'un mécanisme de seconde sphère important pour **GdL₄** compte tenu des nombreuses fonctions carboxylate du peptide. En effet, la présence de trois acides carboxyliques sur ce complexe favorise la formation de liaisons hydrogène avec les molécules d'eau du solvant possédant alors un temps de résidence relativement long dans la seconde sphère de coordination. La présence de ces molécules d'eau à proximité du centre métallique augmente la contribution de la seconde sphère et la relaxivité totale du composé en est augmentée [24]. L'importance du mécanisme de la deuxième sphère est renforcée par une dynamique de rotation qui est ralentie grâce à la taille plus conséquente de **GdL₃**. Etant donné des difficultés de connaître le nombre exact de molécules d'eau en deuxième sphère, leur distance au cation métallique et leur vitesse d'échange, l'analyse exacte des relaxivités est problématique et n'a pas été réalisée.

Chapitre 5

Compte tenu de ces résultats, la coupure des substrats par les enzymes appropriés devrait entraîner l'augmentation du nombre d'hydratation de l'agent de contraste (de 1 à 2) et donc de la relaxivité même si cette augmentation est moindre que ce qui pourrait être attendue sur la base des résultats des systèmes analogues dans la littérature [7].

5.4. Caractérisation des effets paraCEST

5.4.1. Propriétés paraCEST

Les figures **5.17** à **5.20** montrent les spectres CEST obtenus pour différents complexes de lanthanide formés avec les ligands étudiés. Nous nous sommes intéressés aux complexes formés avec l'Ytterbium(III), l'Europium(III), et le Néodyme(III), éléments représentatifs du début, du milieu et de la fin de la série des lanthanides, et connus pour produire des effets CEST importants. Les spectres CEST ont été enregistrés à 25°C, l'acquisition a été réalisée sur une fenêtre de 300ppm (de -150 à 150ppm) avec une saturation appliquée tous les 1 ppm. Ces spectres CEST sont reportés à pH 7.4, en effet, la modification du pH (augmentation ou diminution dans une gamme de pH 6-8) n'a pas montré de changement significatif de l'intensité des effets CEST présentés.

Les trois complexes étudiés pour le ligand **L₁** présentent un effet CEST (**Figure 5.17**). Ces effets se traduisent par un élargissement du pic de l'eau vers 40ppm pour **EuL₁** et vers -40ppm pour **NdL₁**, le complexe **YbL₁** possède lui un effet CEST de l'ordre de 2% à 50ppm. Ces effets CEST proviennent de la fonction amine primaire du complexe, seule fonction à posséder des protons échangeables. Les études menées par Krchova *et al.* sur le complexe d'ytterbium formé avec un ligand comportant un espaceur éthylamine montrent deux effets CEST bien distincts à 40 et 90ppm (pH7.4, 298K, 80mM) [10]. La différence structurelle entre le ligand publié par Krchova *et al.* et **L₁**, réside en la longueur de la chaîne carboné de l'espaceur : éthylamine pour le ligand publié par Krchova *et al.* et propylamine pour **L₁**. Cette variation de taille entraîne une différence de coordination. En effet, sur la structure publiée par Krchova *et al.*, l'amine est coordonné au lanthanide, rapprochant alors les protons labiles du métal favorisant ainsi l'effet CEST. On note néanmoins que les effets CEST observés par ces auteurs sont aussi relativement peu intenses et ont été détectés seulement à des concentrations très élevées (100 mM) et dans un mélange de solvant (H₂O-D₂O 1 :10).

Complexes de Ln^{3+} pour la détection de l'urokinase et de la caspase-3

Dans le cas des complexes formés avec L_1 , la fonction amine n'est pas coordonnée au centre métallique, les protons labiles ne sont alors pas à proximité directe du lanthanide et les effets CEST sont de faible intensité et peu déplacés par rapport au signal de l'eau.

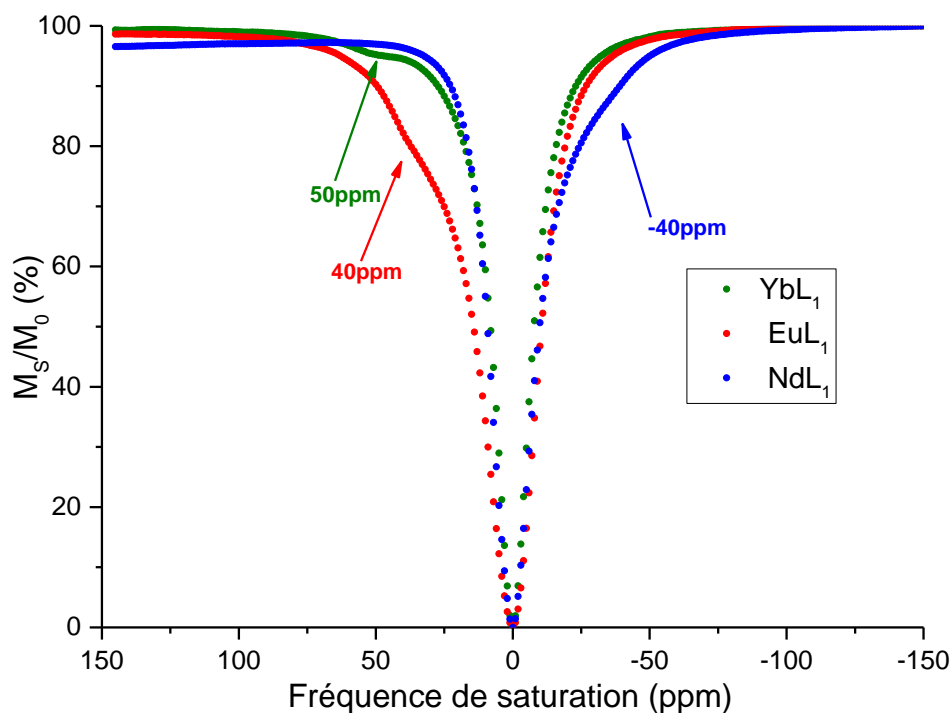


Figure 5.17 : Spectres CEST des complexes YbL_1 (90mM) (●), EuL_1 (82mM) (●) et NdL_1 (90mM) (●), 298K, pH7.4

Sur les complexes formés avec le ligand L_2 , seul le proton de la fonction amide est susceptible de générer un effet CEST. Cependant, malgré la coordination de l'amide sur le centre métallique, et donc la proximité du proton échangeable avec le lanthanide, seul NdL_2 présente un faible élargissement du pic de l'eau vers -30ppm (**Figure 5.18**). Des effets CEST provenant de protons amides ont souvent été reportés dans la littérature [25,26]. Dans ces cas-là, les ligands possèdent quatre protons amide équivalents qui donnent lieu à des effets CEST proche du signal de l'eau (-16ppm pour YbDOTAMGly et -4ppm pour EuDOTAMGly). Dans le cas de LnL_2 , seul un proton amide est susceptible de produire un effet CEST, pour les complexes présentés, cet effet est certainement trop faible et trop proche du pic de l'eau pour pouvoir être observé de façon plus évidente.

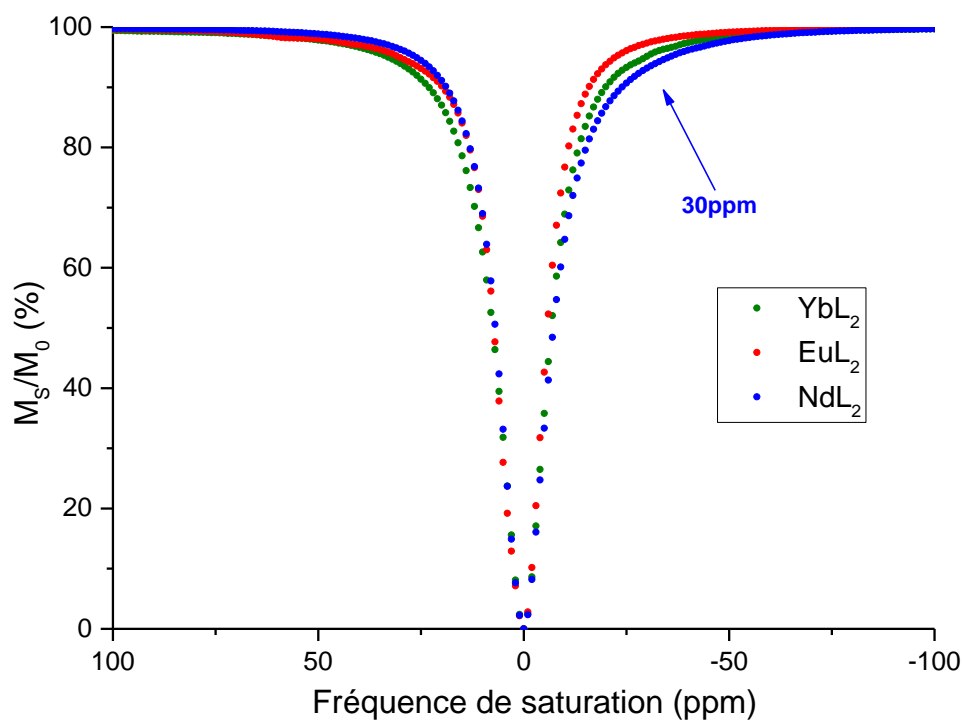


Figure 5.18 : Spectres CEST des complexes **YbL₂** (82mM) (●), **EuL₂** (54mM) (●) et **NdL₂** (83mM) (●), 298K, pH7.4

De même pour les complexes formés avec **L₄**, seul le proton amide de l'espaceur est suffisamment proche du lanthanide (de par la coordination de l'amide) pour générer un effet CEST. Parmi les complexes de lanthanide étudiés seul **YbL₄** présente un effet CEST, de faible intensité, à ~13ppm (**Figure 5.19**).

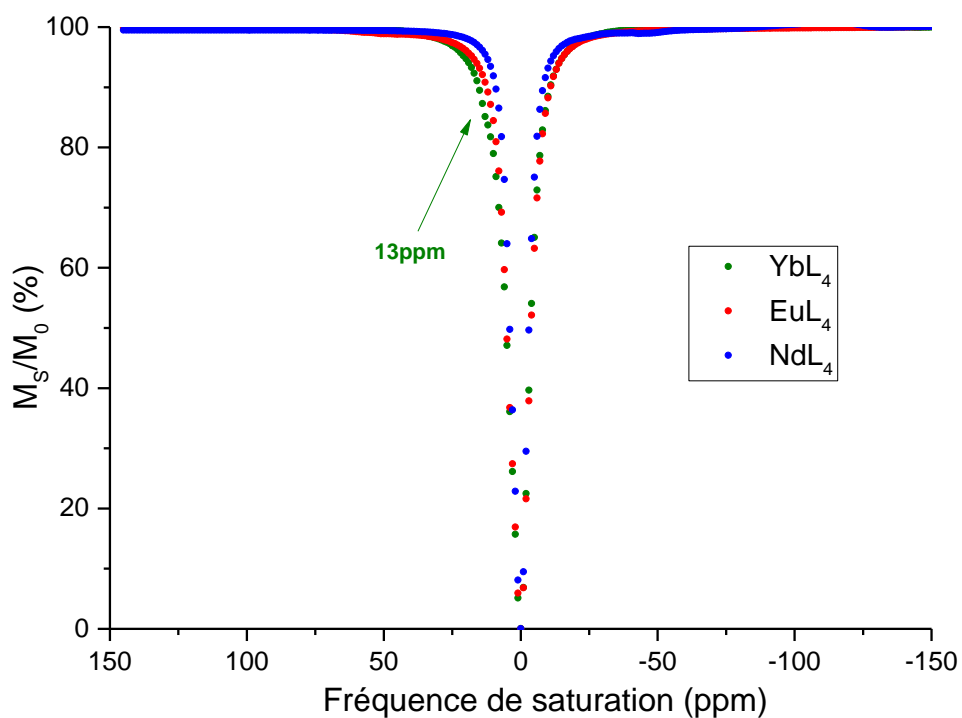


Figure 5.19 : Spectres CEST des complexes **YbL₄** (19mM) (●), **EuL₄** (18mM) (●) et **NdL₄** (17mM) (●), 298K, pH7.4

En revanche, les complexes formés avec le ligand **L₃** présentent tous plusieurs effets CEST (**Figure 5.20**). Ces différents effets CEST peuvent être attribués au proton échangeable de la fonction amide la plus proche du centre métallique mais aussi à la fonction guanidinium présente sur la chaîne latérale de l'arginine.

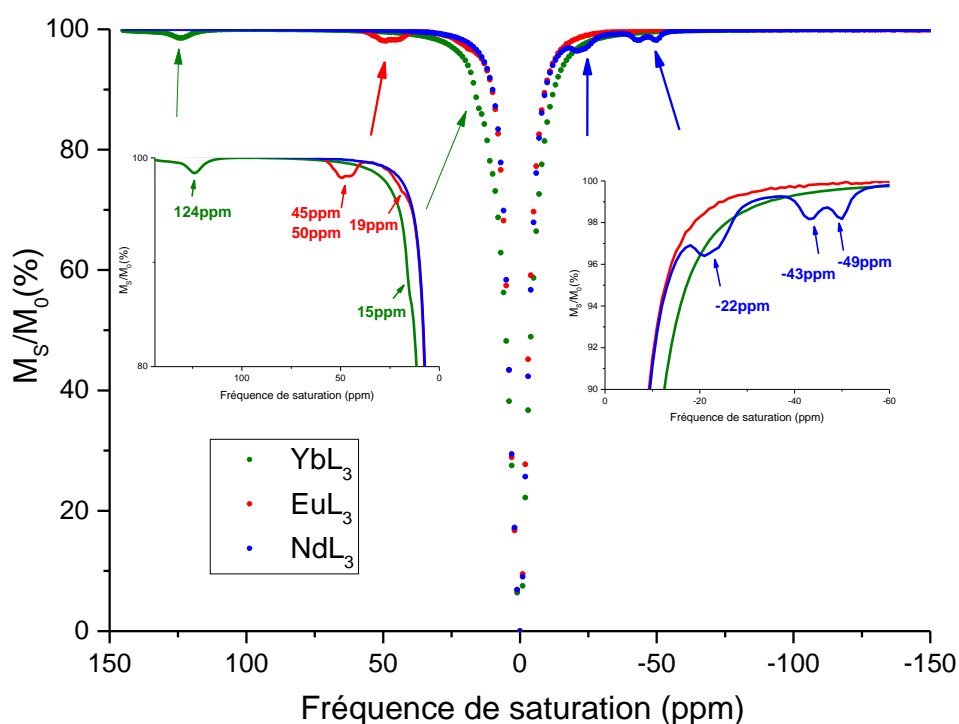


Figure 5.20 : Spectres CEST des complexes **YbL₃** (16mM) (●), **EuL₃** (18mM) (●) et **NdL₃** (18mM) (●), 298K, pH7.4, les inserts correspondent aux zooms des parties d'intérêts

D'après le spectre RMN du composé **YbL₃**, plusieurs isomères sont présents en solution, en effet, dans le cas d'une symétrie C₁, 39 signaux sont attendus alors que nous pouvons en dénombrer plus d'une quarantaine. De plus, pour le composé **YbL₃**, la proportion de chacun des isomères change en fonction du pH, en effet, les spectres RMN présentés figure 4.18 montrent que ce n'est pas le même isomère qui est majoritaire à pH8.2 et à pH6.1 (**figure 5.21**). Les Hydrogènes en position axiale du macrocycle (H_{ax}) sont les signaux les plus déplacés sur les spectres RMN ¹H, et sont de manière générale encore plus déplacés dans le cas des isomères SAP par rapport aux isomères TSAP [27]. Ainsi, et d'après les spectres RMN présentés **figure 5.21**, l'isomère SAP serait majoritaire à pH 6.1 et l'isomère TSAP serait majoritaire à pH 8.2.

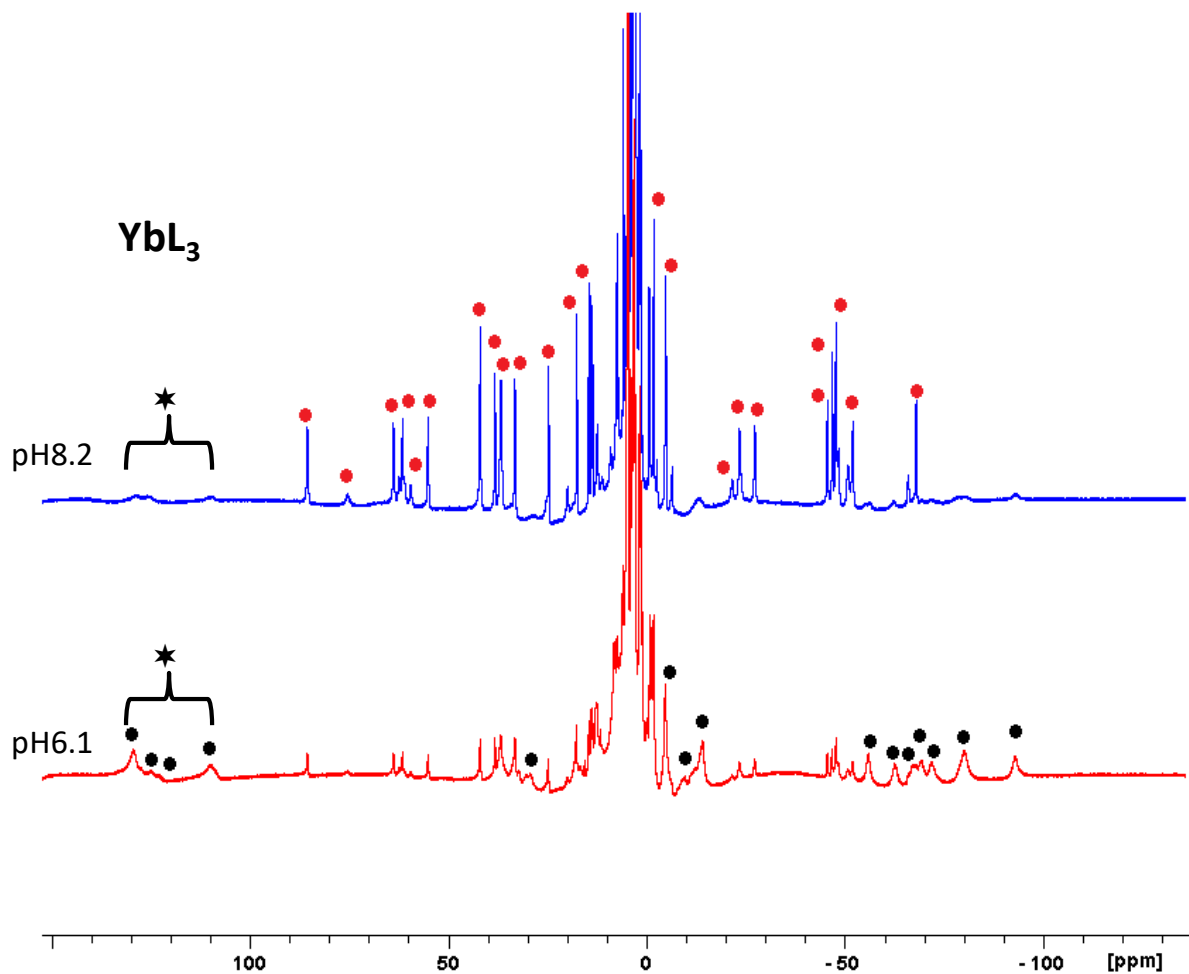


Figure 5.21 : Spectres ^1H RMN du complexe YbL_3 obtenus 25°C . Les pics identifiables, correspondant à l'isomère majoritaire sont représentés par ● pour le spectre pH 8.2 et ● pour le spectre pH 6.1. ★ Représente les H_{ax} appartenant au macrocycle de l'isomère SAP.

Il reste néanmoins difficile d'identifier si les différents effets CEST proviennent des différents isomères SAP/TSAP présents en solution ou, s'ils proviennent à la fois des protons de l'amide coordonnée et du groupement guanidinium. Ces résultats préliminaires montrent des effets CEST de faibles intensités et proches du signal de l'eau (pour LnL_1 , LnL_2 et LnL_4). Bien que l'effet CEST soit difficile à prévoir et à rationaliser, certaines améliorations peuvent être envisagées. Des modifications au niveau des paramètres expérimentaux tels que l'augmentation de la concentration de complexe en solution, ou l'augmentation de la puissance de saturation, par exemple, pourraient permettre d'augmenter l'intensité des effets CEST observés. Des améliorations de la structure moléculaire de ces complexes peuvent aussi être proposées, comme par exemple la diminution de la taille de l'espaceur de manière à rapprocher les protons labiles du centre métallique ce qui pourrait permettre d'augmenter l'intensité de l'effet CEST.

5.5. Etudes enzymatiques

Des essais de coupure enzymatique ont été entrepris pour les complexes **GdL₃** et **GdL₄** afin de démontrer le potentiel intérêt de ces complexes en tant qu'agents de contraste responsifs.

La cinétique de coupure enzymatique a été suivie par des mesures de relaxivité à 20MHz, 37°C.

5.5.1. Suivi de la coupure enzymatique de **GdL₃** par l'urokinase

Le suivi de la coupure enzymatique a été effectué pour une solution de **GdL₃** à 1.2 mM dans 0.5mL de tampon phosphate 50 mM pH7.5 contenant 7 mg/mL de BSA, avec ajout de 500U d'urokinase à une température constante de 37°C (conditions de pH et de température proche des conditions physiologiques).

D'après les valeurs de relaxivité précédemment reportées, l'élimination du substrat par l'action de l'enzyme devrait entraîner une augmentation de la relaxivité de l'ordre de 60%.

Des mesures du temps de relaxation longitudinal (T_1) ont été effectuées toutes les 2 minutes pendant 30min puis toutes les 30min pendant 3h et, finalement, 24h après le début de la réaction. La valeur de relaxivité de départ mesurée dans la solution tamponnée ($r_1 = 3.3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) correspond à la valeur déterminée à 20MHz lors de l'étude NMRD ($r_1 = 3.27 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$), montrant alors qu'il n'existe pas d'interaction entre le complexe **GdL₃** et la BSA.

Aucune variation de la valeur de T_1 n'a été observée pendant le suivi de la réaction enzymatique. L'absence de changement au niveau de la valeur de relaxivité laisse supposer que la coupure du substrat par l'urokinase n'a pas eu lieu. L'absence de coupure enzymatique peut provenir de différents paramètres qui doivent être vérifiés, tels que la validité des conditions de réaction (tampon, température), l'intégrité de l'enzyme ou encore la reconnaissance du substrat par l'enzyme.

Afin de vérifier ces paramètres, la coupure enzymatique du composé fluorescent commercial N-CBZ-GGR-AMC (AMC = 7-amido-4-méthylcoumarine) par l'urokinase a été suivie par

Complexes de Ln^{3+} pour la détection de l'urokinase et de la caspase-3

fluorescence. Ce composé commercial comporte le même enchaînement peptidique (GGR) que L_3 , mais il possède sur sa structure chimique le chromophore AMC dont la fluorescence augmente fortement lorsque celui-ci est libéré du peptide par action de l'enzyme (**figure 5.22**).

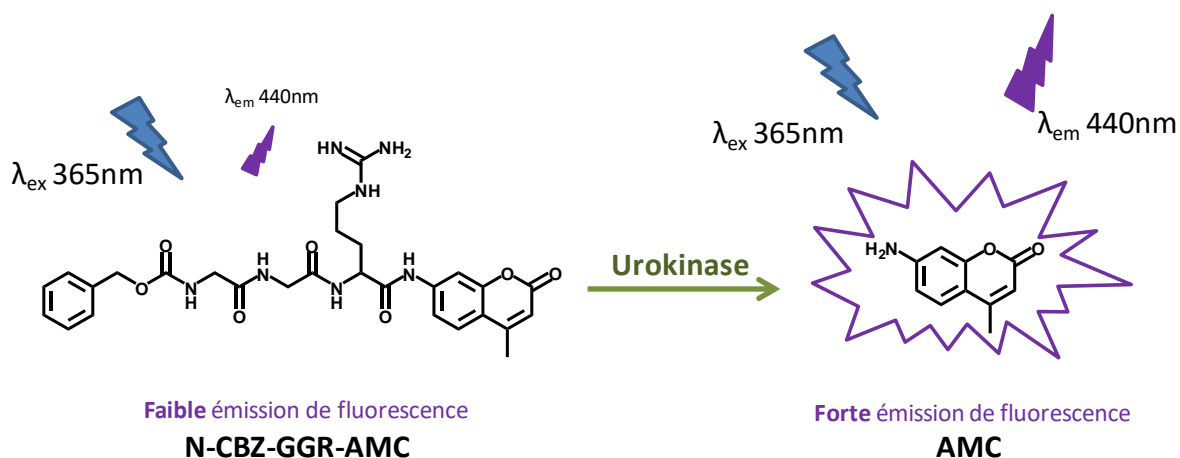


Figure 5.22 : principe du suivi de la coupure enzymatique du composé commercial N-CBZ-GGR-AMC par l'urokinase

Dans un premier temps, la coupure enzymatique de N-CBZ-GGR-AMC par l'urokinase a été suivie par fluorescence dans les mêmes conditions de température, et de tampon que le test de coupure réalisé avec GdL_3 (**figure 5.23**).

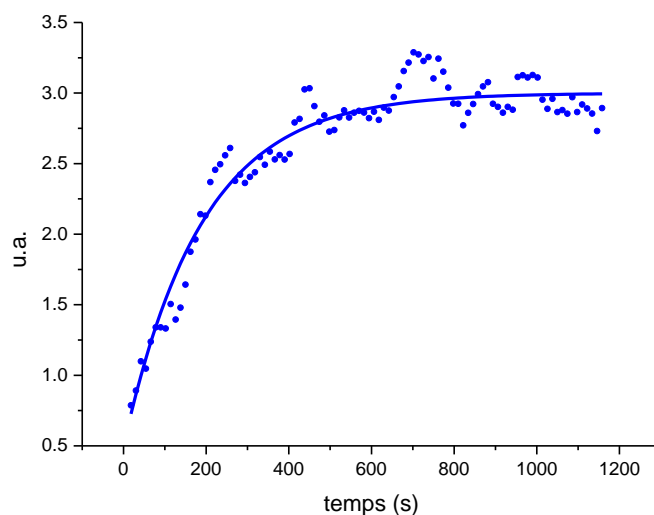


Figure 5.23 : Suivi par fluorescence de la coupure enzymatique de N-CBZ-GGR-AMC par l'urokinase. $0.5\mu\text{M}$ de substrat, 0.5U d'urokinase, 37° , $\lambda_{\text{ex}}=365\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=440\text{nm}$. Le trait représente la courbe de tendance.

L'augmentation de l'intensité de fluorescence au cours de la réaction confirme à la fois l'intégrité de l'enzyme, la reconnaissance du peptide GGR par l'enzyme ainsi que la validité des conditions de réaction.

Chapitre 5

Afin de mettre en évidence l'interaction de **GdL₃** avec l'urokinase, nous avons vérifié l'intégrité de la coupure du substrat commercial N-CBZ-GGR-AMC par l'enzyme en présence de différents équivalents de **GdL₃**. Ces essais ont été réalisés pour une concentration en substrat de 0.7 μ M et différentes concentrations en complexes **GdL₃** allant de 0 à 100 μ M (0 à 140 équivalents) (**figure 5.24**).

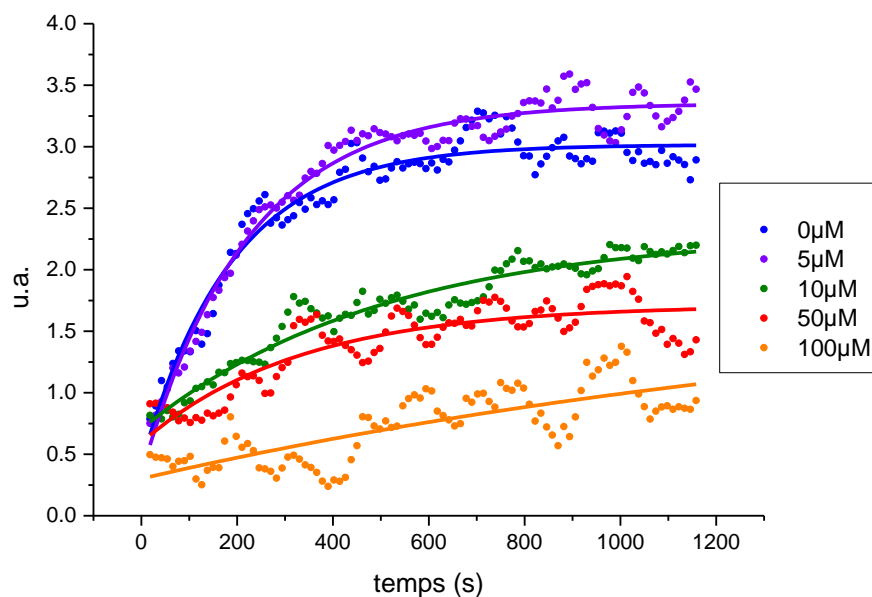


Figure 5.24 : Suivi par fluorescence de la coupure enzymatique de N-CBZ-GGR-AMC par l'urokinase en présence de différentes concentrations de **GdL₃**. 0.5 μ M de substrat, 0.5U d'urokinase, 37°, λ_{ex} =365nm, λ_{em} =440nm. Les traits représentent les courbes de tendance.

La **figure 5.24** montre une diminution de la cinétique de coupure du substrat N-CBZ-GGR-AMC par l'enzyme lorsque la concentration en complexe **GdL₃** augmente. Ces résultats mettent en évidence l'interaction de **GdL₃** avec l'urokinase puisque celui-ci semble inhiber la coupure par l'enzyme du substrat fluorescent modèle.

Les résultats de fluorescence et de relaxivité ainsi obtenus nous permettent de supposer que le substrat du complexe **GdL₃** interagit avec l'urokinase en inhibant son activité sans que le peptide GGR ne soit clivé. Nous avons montré précédemment que la fonction amide séparant le peptide de l'agent de contraste sur **GdL₃** est coordonnée au centre métallique. Ainsi conformé,

le composé permet une reconnaissance des fonctions présentes sur les chaînes latérales du substrat par l'urokinase, mais l'encombrement et la coordination de l'amide au niveau du site de coupure enzymatique ne permet pas à l'enzyme de couper le substrat.

5.5.2. Suivi de la coupure enzymatique de GdL₄ par la caspase-3

De même que pour le complexe **GdL₃**, la coupure enzymatique du complexe **GdL₄** a été étudiée par des mesures de relaxivité. D'après la comparaison des valeurs de r_1 entre l'état de l'agent de contraste avant coupure enzymatique (**GdL₄**) et l'état attendu après coupure enzymatique (**GdL₁**), une augmentation de 56% de la relaxivité devrait être observée.

Le suivi de la coupure enzymatique a été effectué pour une solution de **GdL₄** à 0.94mM dans 0.5mL de tampon HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) (50mM, pH7.4) contenant 100mM de NaCl et 10mM de DTT (1,4-dithiothreitol) qui préserve un environnement réducteur décrit comme nécessaire au maintien de l'activité de l'enzyme [28]. 6.69×10^{-3} Unités de caspase-3 ont été ajoutés à la solution à une température constante de 37°C. De la même manière que pour la coupure enzymatique de **GdL₃** par l'urokinase, aucune modification de la valeur de T_1 mesurée n'a été observée même 24h après le début de la réaction.

Il semble ici encore que la coupure du substrat DEVD sur le complexe **GdL₄** par la caspase-3 n'a pas lieu.

Des études de fluorescence ont également été menées afin de vérifier l'intégrité de la caspase-3 et la validité des conditions expérimentales à l'aide du composé commercial N-acetyl-DEVD-AFC (**figure 5.26**). Le composé N-acetyl-DEVD-AFC est généralement utilisé dans les kits d'essais enzymatiques impliquant la caspase-3 puisque la coupure du peptide DEVD sur le substrat entraîne la libération du chromophore AFC (7-amido-4-trifluorométhylcoumarine) dont la fluorescence est détectable à 460nm (**figure 5.25**).

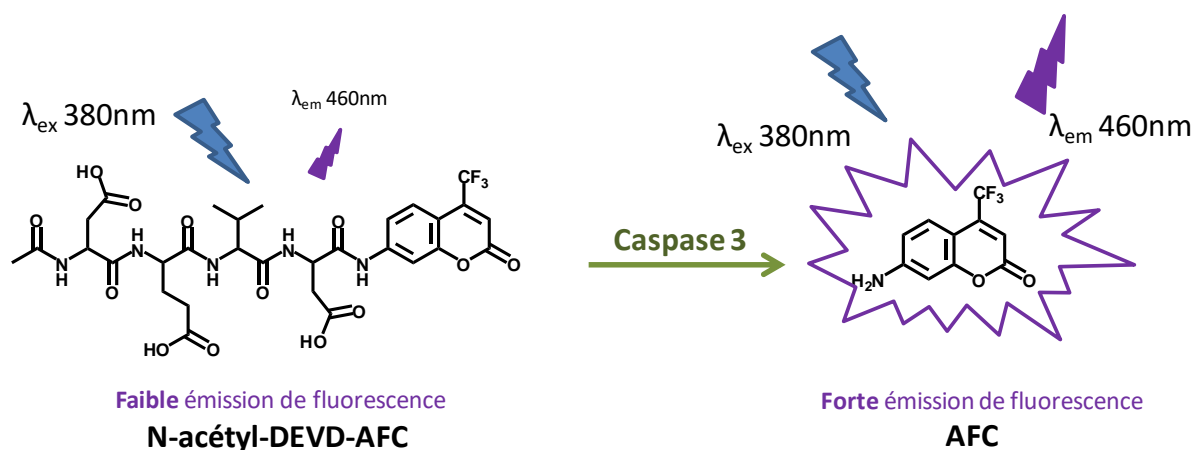


Figure 5.25 : principe du suivi de la coupure enzymatique du composé commercial N-acétyl-DEVD-AFC par la caspase 3.

La cinétique de coupure enzymatique du composé N-acétyl-DEVD-AFC présentée **figure 5.26** a été réalisée dans des conditions expérimentales de tampon et température identique que pour le suivi de la réaction de coupure enzymatique par relaxométrie entre **GdL4** et la caspase-3.

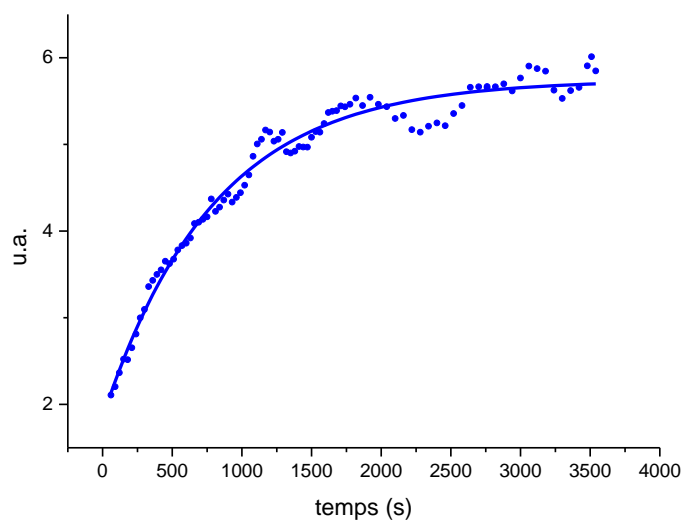


Figure 5.26: Suivi par fluorescence de la coupure enzymatique de N-acetyl-DEVD-AFC par la caspase-3. 0.7 μ M de substrat, 0.005U de caspase-3, 37°, λ_{ex} =380nm, λ_{em} =460nm. Le trait représente la courbe de tendance.

Complexes de Ln^{3+} pour la détection de l'urokinase et de la caspase-3

L'augmentation de l'émission de fluorescence à 460nm montre la libération du fluorophore AFC après élimination du substrat DEVD par la caspase-3 confirmant l'intégrité de l'enzyme et la validité des conditions expérimentales.

Afin de vérifier l'interaction de la caspase-3 avec **GdL4** des tests d'inhibition de la réaction de coupure du substrat N-acetyl-DEVD-AFC par la caspase-3 en présence de différentes concentrations de **GdL4** ont été réalisés (**figure 5.27**).

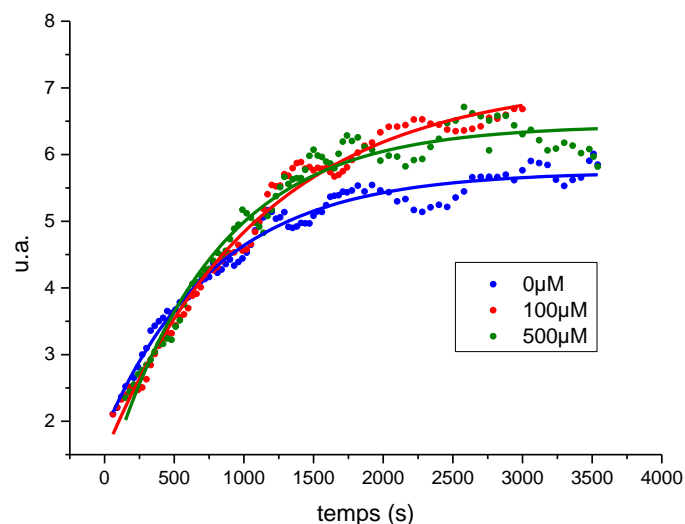


Figure 5.27 : Suivi par fluorescence de la coupure enzymatique de N-acetyl-DEVD-AFC par la caspase-3 en présence de différentes concentrations de **GdL4**. 0.7 μM de substrat, 0.005U de caspase-3, 37°C, λ_{ex} =380nm, λ_{em} =460nm. Les traits représentent les courbes de tendance.

Quelque soit la concentration de **GdL4** présente dans le milieu réactionnel, aucune variation significative de la cinétique de coupure enzymatique du composé N-acetyl-DEVD-AFC par la caspase-3 n'est mise en évidence. Ces résultats montrent que le complexe **GdL4** n'est pas reconnu par l'enzyme. Concernant **GdL4**, nous avons montré la coordination de l'amide du site de coupure enzymatique ainsi que la coordination d'une des fonctions aspartate sur le centre métallique. La présence de ces deux sites de coordination rigidifie le complexe et change sa conformation naturelle. Chacun des acides aminés du substrat DEVD interagit avec les résidus du site actif de la caspase-3, notamment l'acide aspartique situé juste avant le site de coupure, qui interagit à la fois avec l'arginine207 et l'arginine64 par interaction ionique ainsi qu'avec la glutamine161 par formation de liaison hydrogène [29,30]. La coordination de ce résidu acide aspartique sur le lanthanide peut entraîner la perte d'interaction avec les résidus Arg207, Arg64 et Gln161 de la caspase-3 et pourrait alors expliquer la perte de reconnaissance du peptide par l'enzyme.

5.5.3. Bilan des coupures enzymatiques

Si la coordination de l'amide du site de coupure enzymatique est nécessaire pour observer un changement significatif de la relaxivité entre l'état avant et après coupure enzymatique, elle constitue une véritable barrière à l'élimination du substrat par l'enzyme. La détection responsive de l'activité enzymatique des amidases présentées, par mesure du changement de relaxivité lié à une modification de coordination sur le complexe, est fortement compromise. Il est difficile de trouver un équilibre qui permette à la fois la coordination du substrat sur le complexe métallique et la coupure enzymatique. Vu la distance sur le complexe entre la fonction amide et le lanthanide, nous aurions pu nous attendre à une coordination plus faible impliquant un équilibre entre les formes coordonnée et non-coordonnée de l'oxygène de l'amide. Dans une telle situation, l'enzyme pourrait agir sur la forme non-coordonnée de l'agent de contraste et la coupure du substrat pourrait ainsi se faire. Il semble que cette forme décoordonnée n'existe pas ou si elle existe elle n'est pas capable d'être coupée par l'enzyme. La situation est encore plus compliquée dans le cas du substrat de la caspase qui est lui-même impliqué dans la coordination du métal, via ses nombreux carboxylates sur la chaîne latérale. Une des solutions pourrait être d'éloigner le site de coordination du site de coupure enzymatique et de jouer sur une modification des autres paramètres influençant la relaxivité comme le τ_r ou l'hydratation de la seconde sphère de coordination par exemple.

5.6. Conclusion

Nous avons présenté la synthèse et la caractérisation des propriétés de relaxivité et de paraCEST des complexes de lanthanides de trois ligands comportant le substrat de l'enzyme cible ainsi que du complexe de lanthanide modélisant l'état attendu des agents de contraste après la coupure enzymatique. Nous avons démontré par des études de relaxivité et des mesures de temps de vie de luminescence des complexes d' Eu^{3+} , qu'il existe un changement du nombre d'hydratation entre les complexes avant coupure enzymatique (**LnL₂**, **LnL₃** et **LnL₄**) et le composé modélisant l'état après coupure enzymatique (**LnL₄**). Ce changement de q est particulièrement intéressant dans le cadre de la conception d'agents de contraste responsifs pour l'IRM, puisqu'il devrait permettre d'observer une augmentation de la relaxivité après coupure enzymatique.

Des études paraCEST ont également démontré la présence d'effets CEST pour les complexes **YbL₁**, **EuL₁**, **NdL₁**, **YbL₃**, **EuL₃**, **NdL₃**, et **YbL₄**. Néanmoins les effets CEST observés restent faibles et/ou proches du signal de l'eau.

Afin d'avoir un agent de contraste responsif, la proximité du substrat enzymatique avec le complexe de lanthanide sur la structure de l'agent de contraste est nécessaire pour : (i) observer une coordination du substrat sur le métal permettant l'augmentation du nombre d'hydratation de celui-ci, après coupure enzymatique et donc l'augmentation de la relaxivité, et, (ii) pour avoir des protons labiles suffisamment proches du lanthanide afin d'observer un changement des propriétés CEST après la coupure enzymatique.

Cependant, la coordination du substrat sur le lanthanide semble être un facteur limitant de la reconnaissance et de la coupure enzymatique pour les enzymes amidase étudiées.

A notre connaissance aucun agent de contraste responsif pour la détection de l'activité enzymatique par relaxivité ou paraCEST pour lequel le substrat est coordonné au centre métallique n'a été décrit à ce jour.

Le challenge de la conception d'agents de contraste responsifs pour la détection de l'activité enzymatique consiste à trouver l'équilibre permettant à la fois d'observer des propriétés CEST et r_1 satisfaisante, sans bloquer l'accès au site de coupure enzymatique.

5.7. Références

- (1) Mason, S. D.; Joyce, J. A.: Proteolytic networks in cancer. *Trends in Cell Biology April 2011, Vol. 21, No. 4.*
- (2) Schellenberger, E.; Rudloff, F.; Warmuth, C.; Taupitz, M.; Hamm, B.; Schnorr, J.: Protease-Specific Nanosensors for Magnetic Resonance Imaging. *Bioconjugate Chemistry* **2008**, *19*, 2440-2445.
- (3) Gringeri, C. V.; Menchise, V.; Rizzitelli, S.; Cittadino, E.; Catanzaro, V.; Dati, G.; Chaabane, L.; Digilio, G.; Aime, S.: Novel Gd(III)-based probes for MR molecular imaging of matrix metalloproteinases. *Contrast media & molecular imaging* **2012**, *7*, 175-184.
- (4) Andreasen, P. A.; Egelund, R.; Petersen, H. H.: The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2000**, *57*, 25-40.
- (5) Porter, A. G.; Janicke, R. U.: Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. In *Cell Death and Differentiation*, 1999.
- (6) Byunghee, Y.; Raam, M. S.; Rosenblum, R. M.; Pagel, M. D.: Enzyme-responsive PARACEST MRI contrast agents: a new biomedical imaging approach for studies of the proteasome. *Contrast media & molecular imaging* **2007**, *2*, 189-198.
- (7) Congreve, A.; Parker, D.; Gianolio, E.; Botta, M.: Steric control of lanthanide hydration state: fast water exchange at gadolinium in a mono-amide 'DOTA' complex. *Dalton Transactions* **2004**, 1441-1445.
- (8) Dhingra, K.; Fousková, P.; Angelovski, G.; Maier, M. E.; Logothetis, N. K.; Tóth, É.: Towards extracellular Ca²⁺ sensing by MRI: synthesis and calcium-dependent 1H and 17O relaxation studies of two novel bismacrocyclic Gd³⁺ complexes. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2008**, *13*, 35-46.
- (9) Angelovski, G.; Fouskova, P.; Mamedov, I.; Canals, S.; Toth, E.; Logothetis, N. K.: Smart Magnetic Resonance Imaging Agents that Sense Extracellular Calcium Fluctuations. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1729-1734.
- (10) Krchova, T.; Kotek, J.; Jirak, D.; Havlickova, J.; Cisarova, I.; Hermann, P.: Lanthanide(iii) complexes of aminoethyl-DO3A as PARACEST contrast agents based on decoordination of the weakly bound amino group. *Dalton Transactions* **2013**, *42*, 15735-15747.
- (11) Chen, G.; Wardle, N. J.; Sarris, J.; Chatterton, N. P.; Bligh, S. W. A.: Sensitized terbium(iii) macrocyclic-phthalimide complexes as luminescent pH switches. *Dalton Transactions* **2013**, *42*, 14115-14124.
- (12) Henig, J.; Mamedov, I.; Fouskova, P.; Tóth, É.; Logothetis, N. K.; Angelovski, G.; Mayer, H. A.: Influence of Calcium-Induced Aggregation on the Sensitivity of Aminobis(methylenephosphonate)-Containing Potential MRI Contrast Agents. *Inorganic chemistry* **2011**, *50*, 6472-6481.
- (13) Reddy, D. N.; Prabhakaran, E. N.: Synthesis and Isolation of 5,6-Dihydro-4H-1,3-Oxazine Hydrobromides by Autocyclization of N-(3-Bromopropyl)amides. *The Journal of Organic Chemistry* **2011**, *76*, 680-683.
- (14) Yoo, B.; Sheth, V. R.; Pagel, M. D.: An amine-derivatized, DOTA-loaded polymeric support for Fmoc solid phase peptide synthesis. *Tetrahedron letters* **2009**, *50*, 4459-4462.
- (15) Yoo, B.; Pagel, M. D.: Peptidyl Molecular Imaging Contrast Agents Using a New Solid-Phase Peptide Synthesis Approach. *Bioconjugate Chemistry* **2007**, *18*, 903-911.
- (16) Jensen, K. J.; Alsina, J.; Songster, M. F.; Vágner, J.; Albericio, F.; Barany, G.: Backbone Amide Linker (BAL) Strategy for Solid-Phase Synthesis of C-Terminal-Modified and Cyclic Peptides^{1,2,3}. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 5441-5452.
- (17) Shannon, S. K.; Barany, G.: Colorimetric Monitoring of Solid-Phase Aldehydes Using 2,4-Dinitrophenylhydrazine. *Journal of Combinatorial Chemistry* **2004**, *6*, 165-170.

Complexes de Ln³⁺ pour la détection de l'urokinase et de la caspase-3

- (18) Carpino, L. A.: 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 4397-4398.
- (19) Behrendt, R.; Huber, S.; Martí, R.; White, P.: New t-butyl based aspartate protecting groups preventing aspartimide formation in Fmoc SPPS. *Journal of Peptide Science* **2015**, *21*, 680-687.
- (20) Peterson, Q. P.; Goode, D. R.; West, D. C.; Botham, R. C.; Hergenrother, P. J.: Preparation of the caspase-3/7 substrate Ac-DEVD-pNA by solution-phase peptide synthesis. *Nature Protocols* **2010**, 294.
- (21) Axelsson, O.; Olsson, A.: Synthesis of cyclen derivatives. Google Patents, 2012.
- (22) E.Toth; Helm, L.; Merbach, A.: Relaxivity of Gadolinium(III) Complexes: Theory and Mechanism. In *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*; John Wiley & Sons, Ltd, **2013**; pp 25.
- (23) Supkowski, R. M.; Horrocks Jr, W. D.: On the determination of the number of water molecules, q, coordinated to europium(III) ions in solution from luminescence decay lifetimes. *Inorganica Chimica Acta* **2002**, *340*, 44-48.
- (24) Aime, S.; Botta, M.; Terreno, E.: Gd(III)-BASED CONTRAST AGENTS FOR MRI. In *Advances in Inorganic Chemistry*; Academic Press, 2005; Vol. Volume 57; pp 173-237.
- (25) Terreno, E.; Castelli, D. D.; Cravotto, G.; Milone, L.; Aime, S.: Ln(III)-DOTAMGly Complexes: A Versatile Series to Assess the Determinants of the Efficacy of Paramagnetic Chemical Exchange Saturation Transfer Agents for Magnetic Resonance Imaging Applications. *Investigative Radiology* **2004**, *39*, 235-243.
- (26) [Aime, S.; Barge, A.; Delli Castelli, D.; Fedeli, F.; Mortillaro, A.; Nielsen, F. U.; Terreno, E.: Paramagnetic Lanthanide(III) complexes as pH-sensitive chemical exchange saturation transfer (CEST) contrast agents for MRI applications. *Magnetic Resonance in Medicine* **2002**, *47*, 639-648.
- (27) Woods, M.; Aime, S.; Botta, M.; Howard, J. A. K.; Moloney, J. M.; Navet, M.; Parker, D.; Port, M.; Rousseaux, O.: Correlation of Water Exchange Rate with Isomeric Composition in Diastereoisomeric Gadolinium Complexes of Tetra(carboxyethyl)dota and Related Macrocyclic Ligands. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 9781-9792.
- (28) Okun, I.; Malarchuck, S.; E.Dubrovskaya; A.Khvat; Tkachenko, S.; V.Kysil; Kravchenko, D.; Ivachtchenko, A.: Screening for Caspase-3 Inhibitors : Effect of Reducing Agent on Identified Hit Chemotypes. *j. Biomol. Screen.* **2006**, *11*, 694-703.
- (29) -Fang, B.; Boross, P. I.; Tozser, J.; Weber, I. T.: Structural and kinetic analysis of caspase-3 reveals role for S5 binding site in substrate recognition. *Journal of Molecular Biology* **2006**, *360*, 654-666.
- (30) Rotonda, J.; Nicholson, D. W.; Fazil, K. M.; Gallant, M.; Gareau, Y.; Labelle, M.; Peterson, E. P.; Rasper, D. M.; Ruel, R.; Vaillancourt, J. P.; Thornberry, N. A.; Becker, J. W.: The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Mol Biol* **1996**, *3*, 619-625.

Chapitre 6

Etudes de stabilité thermodynamique et inertie cinétique : Etude de complexes de manganèse(II) à base de pyridine

Table des matières

6.1. Introduction	195
6.2. Propriétés Thermodynamiques	197
6.2.1. Constantes de protonation	197
6.2.2. Constantes de stabilité.....	198
6.3. Propriétés cinétiques	203
6.4. Propriétés de relaxation	207
6.4.1. Mesures de relaxivité des complexes $[\text{MnL6}]^{2-}$ et $[\text{MnL7}]^{-}$	207
6.4.2. Mesures de RMN de l' ^{17}O et de NMRD ^1H sur le complexe $[\text{MnL7}]^{-}$	208
6.5. Conclusion	214
6.6. Références	215

6.1. Introduction

La découverte de la fibrose systémique néphrogénique (FSN), a motivé le développement de nouveaux agents de contraste « plus sûrs ». Une possibilité pour obtenir des agents de contraste moins nocifs est de remplacer le Gd^{3+} (toxique) par un ion métallique paramagnétique mieux toléré par les systèmes vivants, tel que l'ion endogène Mn^{2+} . Ses 5 électrons non appariés et sa relaxation électronique lente font de l'ion Mn^{2+} un bon candidat pour substituer le Gd^{3+} dans les agents de contraste T_1 pour l'IRM [1].

Pour être de bons agents de contraste potentiels, en plus d'une relaxivité élevée, les complexes de Mn^{2+} doivent avoir une stabilité thermodynamique et une inertie cinétique appropriée à une utilisation *in-vivo*. En général la stabilité thermodynamique des complexes de Mn^{2+} est inférieure à celle des complexes de Gd^{3+} ce qui est principalement lié à la plus faible charge de l'ion Mn^{2+} . De plus, la configuration électronique symétrique d^5 du Mn^{2+} confère à ses complexes une faible énergie de stabilisation de champ du ligand. En conséquence, les complexes de Mn^{2+} possèdent des constantes de stabilité plus faibles que celles des complexes formés avec d'autres métaux de transition divalents comme le Co^{2+} , le Ni^{2+} ou le Cu^{2+} [2].

L'inertie cinétique est également un autre paramètre important à considérer pour l'utilisation *in-vivo* des complexes de Mn^{2+} . La dissociation des complexes mène à la formation du ligand libre et du métal libre, tous deux potentiellement toxiques à haute concentration *in-vivo*. Les réactions de transmétallation des complexes ont en général lieu par lente dissociation du complexe suivant différentes voies qui peuvent être catalysées par les protons (dissociation proton-assistée) ou par l'attaque directe d'un cation endogène comme le Cu^{2+} et le Zn^{2+} sur le complexe (dissociation métal-assistée), alors que la dissociation spontanée apporte généralement une faible contribution au processus global de dissociation [3]. De plus, pour certains complexes linéaires de Gd^{3+} , des résultats récents indiquent que des ligands endogènes (phosphate, citrate, etc.) peuvent également, sous leurs formes protonées, accélérer la dissociation.

Pour les complexes de Mn^{2+} , l'analyse des constantes d'équilibre et des données de cinétique disponibles dans la littérature met en évidence que dans certains cas, le Ca^{2+} peut également

Chapitre 6

agir comme un « initiateur » du processus de dissociation puisque les stabilités de leurs complexes sont similaires et que le Ca^{2+} est présent en concentration élevée dans les fluides corporels. D'autre part, la dissociation spontanée peut avoir une contribution importante à la cinétique de dissociation totale (pour les complexes avec une faible constante de stabilité) [4]. Dans le cadre de la conception d'agents de contraste, de nombreux ligands ont récemment été étudiés pour la complexation du manganèse, incluant les ligands linéaires et macrocycliques [1,2,5-7]. Comme cela a déjà été indiqué dans la littérature [8,9], la rigidité du ligand est un facteur important pour l'inertie cinétique des complexes. Ces constatations nous ont orientés vers l'étude de ligands à base de pyridine (**L5**, **L6** and **L7**) reconnus pour être de bons agents chélatant (d'un point de vue de la stabilité thermodynamique, de l'inertie cinétique, du nombre d'hydratation, de constantes de vitesse d'échange d'eau) pour la complexation du Gd^{3+} [10-12]. En particulier, l'inertie cinétique du **GdL5** est remarquable pour un complexe bishydraté [11]. Cependant, les complexes formés avec l'ion Mn^{2+} restent inexplorés. Sur la structure moléculaire des ligands présentés ici, l'unité pyridine est insérée entre deux bras iminodiacetate (**L5**, et **L6**), alors que, sur le ligand **L7**, le nombre d'atomes donneurs potentiels est diminué (**figure 6.1**), dans le but d'obtenir une meilleure relaxivité pour le complexe de Mn^{2+} en permettant la coordination d'une molécule d'eau au métal, en contraste avec les complexes non-hydratés formés avec **L5**, et **L6**.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de la stabilité thermodynamique et de l'inertie cinétique des complexes formés avec ces trois ligands et l'ion Mn^{2+} , ainsi qu'avec d'autres cations métalliques endogènes. Des études d' ^{17}O et de NMRD ^1H ont également été réalisées pour caractériser les propriétés de relaxation du complexe [**MnL7**]. La plupart des études de stabilité thermodynamique et cinétique ont été réalisées dans l'équipe du Dr. Gyula Tircso, au Département de Chimie Inorganique et Analytique à l'Université de Debrecen, Hongrie, dans le cadre d'un projet de collaboration financé par le programme Balaton (séjour de trois mois) et COST. La synthèse des ligands a été effectuée au laboratoire par le Dr. F. Callé (*cf.* partie expérimentale).

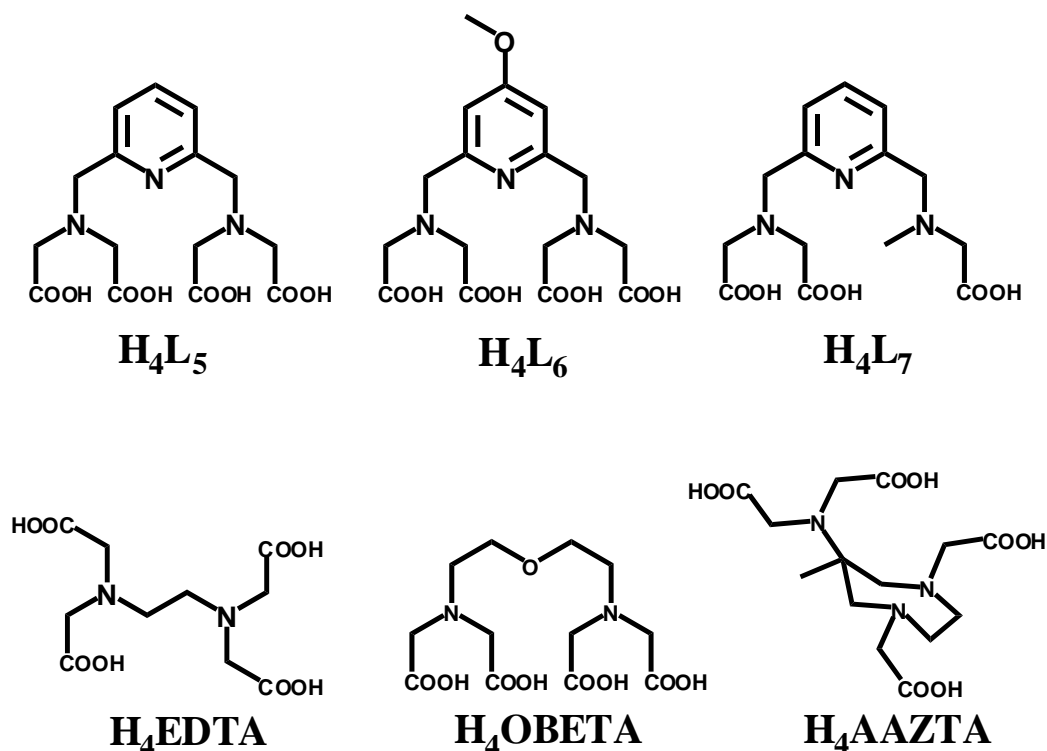


Figure 6.1: Structure des ligands discutés dans ce chapitre

6.2. Propriétés Thermodynamiques

6.2.1. Constantes de protonation

Les constantes de protonation des ligands **H₄L₅**, **H₄L₆** et **H₃L₇**, définies par l'équation 6.1 ont été déterminées par titrage potentiométrique à une force ionique $I = 0.15M$ NaCl et à 25°C.

Les constantes de protonation ainsi que la basicité totale des ligands sont présentées dans le tableau 6.1.

$$K_i^H = \frac{[H_iL]}{[H_{i-1}L][H^+]} \quad i = 1 - 5 \quad (6.1)$$

La basicité totale de **H₄L₅** est comparable à celle du ligand H₄EDTA alors qu'elle est supérieure pour **H₄L₆** et **H₃L₇**. Néanmoins, la basicité de ces deux derniers reste comparable à celle des ligands H₄OBETA et H₄AAZTA (Figure 6.1).

Chapitre 6

Pour chacun des ligands étudiés, plusieurs constantes de protonation ont pu être déterminées. Les deux premières constantes de protonation correspondent à la protonation des deux amines aliphatiques tandis que les deux dernières constantes de protonation de **L10** et les trois dernières constantes de protonation de **L6** et **L7** appartiennent aux fonctions acétates. La protonation de l'azote de la pyridine n'est pas observée dans les conditions expérimentales (pH 1.8-12), comme cela a déjà été reporté [10].

Pour chacun des ligands étudiés (**H4L5**, **H4L6** et **H3L7**), les premières constantes de protonation K_{H1} sont légèrement inférieures à celle des ligands **H4EDTA**, **H4OBETA** et **H4AAZTA**, suggérant que la présence de la fonction pyridine diminue la basicité des azotes exocycliques. Les deuxièmes constantes de protonation, $\log K_{H2}$, sont inférieures pour les ligands **H4AAZTA** et **H4EDTA**, conséquence de la répulsion électrostatique qui devient plus importante entre les groupements protonés dans une structure moléculaire plus petite.

Tableau 6.1 Constantes de protonation des ligands

	H4L5	H4L6	H3L7	H4EDTA ^a	H4OBETA ^b	H4AAZTA ^c
log K_{H1}	8.44(2)	8.47(2)	8.74(1)	9.17	9.34	9.97
log K_{H2}	7.94(1)	7.79(1)	8.11(1)	5.99	8.32	6.42
log K_{H3}	2.76(1)	2.73(2)	2.88(1)	2.73	3.19	3.75
log K_{H4}	1.91(1)	2.77(1)	1.73(1)	2.01	2.19	1.94
log K_{H5}	-	1.87(2)	1.47(2)	1.38	1.77	-
$\Sigma \log K_{Hi}$	21.05	23.63	22.93	21.28	23.34	22.06

Mesures effectuées à 25°C et $I=0.15M$ NaCl. La déviation standard est représentée entre parenthèse a : 25°C, $I=0.15M$ NaCl, référence [13]. b : 25°C, $I=0.1 M$ KCl, référence [3]. c : 25°C, $I=0.15M$ NaCl, référence [14].

6.2.2. Constantes de stabilité

Les constantes de stabilité des complexes formés entre les ligands et le Mn^{2+} , ainsi que d'autres cations endogènes ont été mesurées par titrages potentiométriques à 25°C et à une force ionique de $I=0.15M$ NaCl (**figure 6.2**). Etant donné que le Cu^{2+} forme des complexes très stables avec les ligands de type polyaminocarboxylate, les stabilités des complexes $[CuL5]^{2-}$, $[CuL6]^{2-}$ et $[CuL7]$ ont été déterminées en combinant les méthodes de pH-potentiométrie et de spectrophotométrie UV-visible. Les spectres UV-visible des complexes **CuL5** et **CuL7** sont montrés **figure 6.3**.

Étude de stabilité thermodynamique et inertie cinétique de complexes de Mn^{2+}

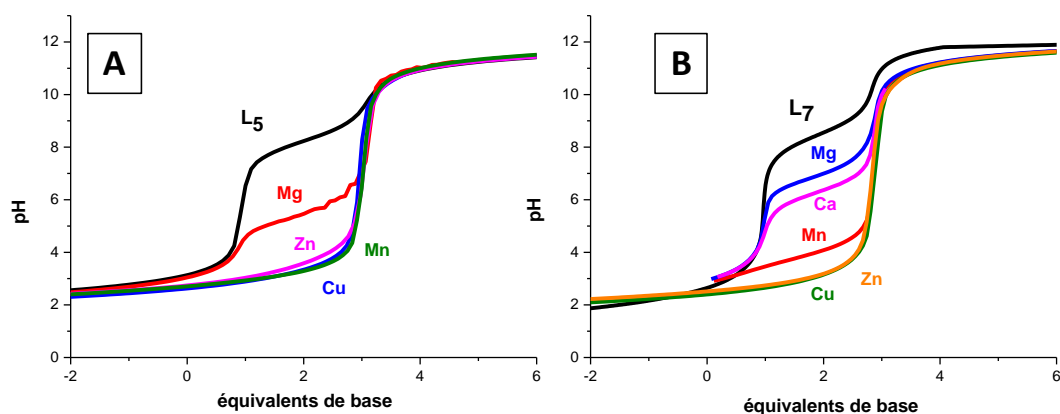


Figure 6.2: Titrage potentiométrique des solutions de H_4L_5 (1.87mM) (A) et H_3L_7 (2.33mM) (B), avec 0 et 1 équivalent de $MgCl_2$, $CaCl_2$, $MnCl_2$, $ZnCl_2$ et $CuCl_2$. $I = 0.15M$ NaCl ; 298 K.

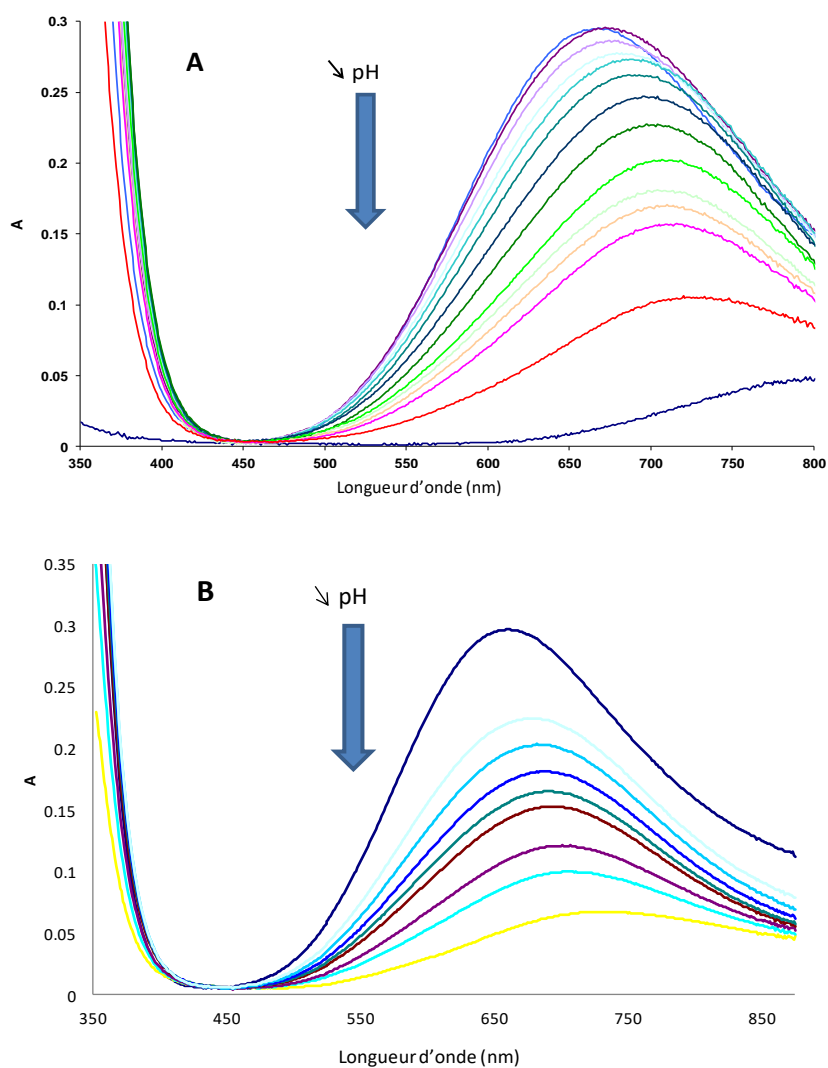


Figure 6.3: Spectres UV-visible des complexes de Cu^{2+} en présence de concentrations croissantes de H^+ pour : $[CuL_5]^{2-}$ (2.63 mM) ($[H^+]$ de 0.01362 M à 0.9852 M) (A) et $[CuL_7]^-$ (2.5 mM) ($[H^+]$ de 0.00939 M à 0.5085 M) (B) à 25°C, $I = 1.0$ M NaCl.

Chapitre 6

Les constantes de stabilité ($\log K_{ML}$) et les constantes de protonation ($\log K_{MLH^i}$) des différents complexes calculées selon les équations 6.2 et 6.3, sont reportées dans le tableau 6.2.

$$K_{ML} = \frac{[ML]}{[M][L]} \quad (6.2)$$

$$K_M^H = \frac{[MHL]}{[ML][H^+]} \quad (6.3)$$

Tableau 6.2: Constantes de stabilité des complexes.

		Mn ²⁺	Cu ²⁺ a	Zn ²⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	pMn ⁱ
L ₅	log K _{ML}	14.13(2)	17.63 ^b	14.83(2)	8.51(2)	9.43 ^c	8.72
	log K _{ML} ^H	2.78(3)	3.45	3.68(1)	-	-	
	log K _{MLH} ^H	2.32(5)	-	2.19(1)	-	-	
L ₆	log K _{ML}	13.89(1)	15.53 ^c	16.93 ^c		9.81 ^c	8.64
	log K _{ML} ^H	3.03(1)	3.37	3.70		-	
L ₇	log K _{ML}	11.97(2)	18.91(2)	15.57(2)	6.03(1)	7.27(1)	7.42
	log K _{ML} ^H	3.54(4)	3.09(2)	2.67(2)	6.29(7)	5.94(3)	
	log K _{MLH} ^H	3.26(8)	1.91(2)	2.03(3)	-	-	
	log K _{MLH} ^{OH}	12.11(2)	-	12.38(4)	-	-	
	log K _{M2L}	-	-	17.87(6)	-	-	
EDTA	log K _{ML}	12.46 ^d		14.61 ^e	7.75 ^e	9.36 ^e	7.83 ^d
	log K _{ML} ^H	2.95		-	-	-	
OBETA	log K _{ML}	13.57 ^f	18.40 ^f	15.00 ^f	7.95 ^f	9.77 ^f	7.83 ^f
	log K _{ML} ^H	3.45	3.71	3.18	-	-	
	log K _{MLH} ^H	-	2.05	-	-	-	
	log K _{M2L}	-	5.74	2.05	-	-	
	log K _{M2LH-1}	-	6.42	-	-	-	
	log K _{M2LH-2}	-	8.56	-	-	-	

Résultats obtenus à 25°C et I=0.15M NaCl). La déviation standard est représentée entre parenthèse
a: déterminé en utilisant la combinaison des données de pH-potentiométrie et de spectrophotométrie UV-visible ; b : 25°C, I=0.15M NaCl réf. [12]; c : 25°C, I=0.1M KCl réf. [11]; d : 25°C, I=0.15M NaCl réf. [13]; e : 37°C, I=0.15M NaCl réf. [15]; f: 25°C, I=0.1M KCl réf. [3]; g : 25°C, I=0.15M NaCl réf [14]; h : 25°C, I=0.1M KCl réf [16]; i : pMn calculé pour [Mn]=10µM, [L]=10µM, pH=7.4.

Étude de stabilité thermodynamique et inertie cinétique de complexes de Mn^{2+}

Des constantes de stabilité obtenues pour les complexes $[MnL_5]^{2-}$ et $[MnL_6]^{2-}$ sont comparables; elles sont similaires à celles décrites pour $[MnOBETA]^{2-}$ (tableau 6.2). Conformément à ce qui était attendu, la perte d'un bras de complexation sur le ligand L_7 entraîne une diminution de la stabilité du complexe $[MnL_7]^-$ en comparaison à $[MnL_5]^{2-}$ et $[MnL_6]^{2-}$.

Pour les systèmes $Mn^{2+}: L_6$ et $Mn^{2+}: L_7$ (1:1), les relaxivités ont également été mesurées en fonction du pH. La dépendance de la relaxivité r_{1p} du pH et les diagrammes de distribution d'espèces obtenus selon les constantes déterminées par pH-potentiométrie sont montrés en **figure 6.4** et **6.5**, respectivement. Pour les deux complexes, les deux courbes sont en parfaite cohérence ce qui confirme la fiabilité des modèles d'équilibre utilisés pour la description des courbes de titrage potentiometrique.

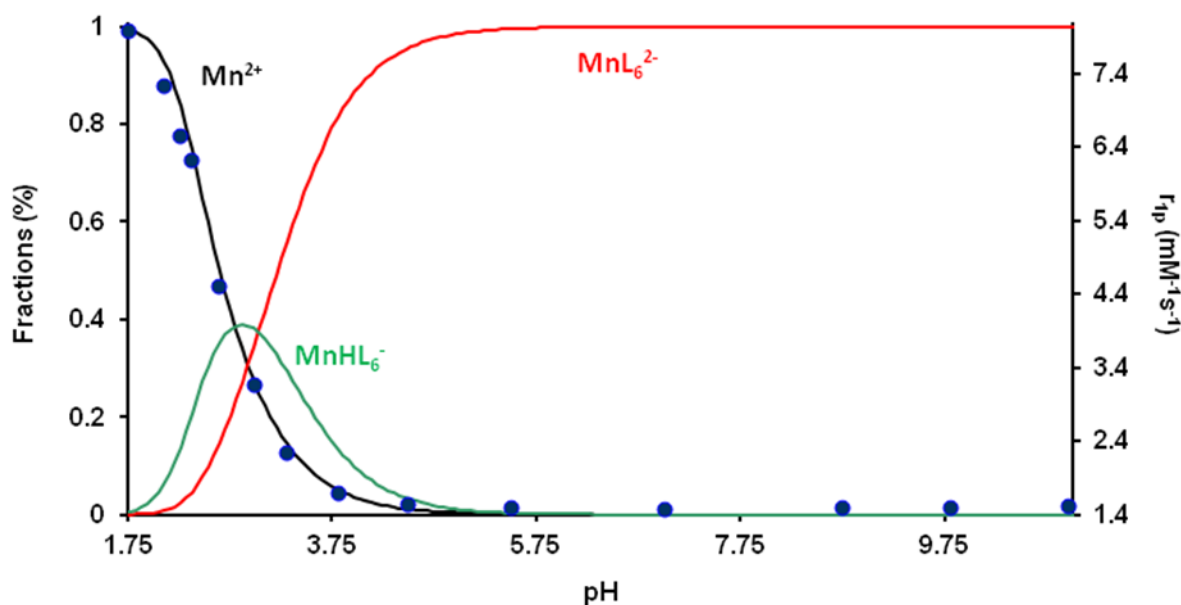


Figure 6.4: Relaxivité 1H (r_{1p}) (●) et diagramme de distribution d'espèces pour le système $Mn^{2+}: L_6$ (1:1) en fonction du pH ($C_{Mn^{2+}} = C_{L_6} = 1mM$, $I = 0.15 M$, $20MHz$, $25^\circ C$).

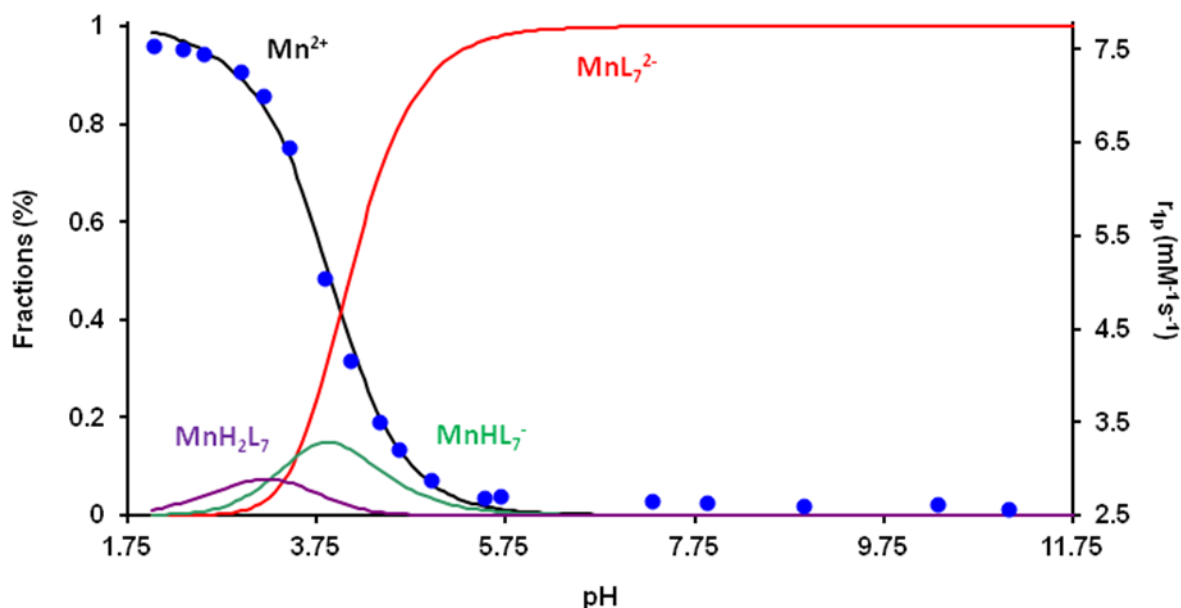


Figure 6.5: Relaxivité ^1H (r_{1p}) (●) et diagramme de distribution d'espèces pour le système $\text{Mn}^{2+} : \text{L}_7$ (1:1) en fonction du pH ($c_{\text{Mn}^{2+}} = c_{\text{L}_7} = 1\text{mM}$, $I = 0.15\text{ M}$, 20MHz , 25°C).

Pour chacun des trois ligands présentés, les complexes de Cu^{2+} et de Zn^{2+} possèdent des constantes de stabilité plus élevées que les complexes formés avec le Mn^{2+} , suivant l'ordre de stabilité Irving-William [17]. Les différences de stabilité entre ces cations divalents de la même série sont en partie expliquées par leurs configurations électroniques. En effet, le Mn^{2+} possède une configuration électronique d^5 « haut spin » qui ne produit pas de stabilisation de champs du ligand. Ainsi, les ions Mg^{2+} et Ca^{2+} forment avec les ligands H_4L_5 , H_4L_6 et H_3L_7 , des complexes possédant une stabilité relativement faible.

Puisque la comparaison des constantes de stabilité ne donne pas d'information directe sur la stabilité relative des complexes (les $\log K_{\text{ML}}$ dépendent de la basicité du ligand, qui peut être différente d'un ligand à un autre), la valeur caractérisant la concentration en ion Mn^{2+} libre a été calculée pour chaque complexe ($\text{pMn} = -\log [\text{Mn}^{2+}]$, d'après les conditions proposées par Drahos *et al.* ($c_{\text{Mn}} = 10\mu\text{M}$, $c_{\text{L}} = 10\mu\text{M}$ et $\text{pH} = 7.4$) et comparée avec celle de $[\text{MnEDTA}]^{2-}$ et $[\text{MnOBETA}]^{2-}$ (tableau 6.2). Plus les valeurs de pMn sont élevées, plus la stabilité est élevée ; toutefois, il est important de noter que la valeur minimale possible pour pMn est de 5 (dans le cas où il n'y a pas complexation). Comme montré dans le tableau 6.2, les valeurs de pMn les plus élevées ont été obtenues pour $[\text{MnL}_5]^{2-}$ et $[\text{MnL}_6]^{2-}$, indiquant alors que ces complexes possèdent les meilleures stabilités à pH 7.4. Les ligands H_4L_5 et H_4L_6 forment avec Mn^{2+} des complexes plus stables que l' H_4EDTA .

6.3. Propriétés cinétiques

Dans le but d'étudier les constantes de vitesse de dissociation des complexes de Mn^{2+} en présence d'un autre cation endogène, des études de transmétallation par Cu^{2+} ou Zn^{2+} sont le plus souvent réalisées. Compte tenu de la faible absorption molaire des complexes de Mn^{2+} , les réactions de transmétallation peuvent être suivies à la fois par relaxivité 1H (en suivant l'augmentation de la relaxivité, significative de la libération de Mn^{2+}) ou par spectrophotométrie UV-visible, en utilisant un ion métallique possédant des propriétés d'absorbance, tel que le Cu^{2+} par exemple (en suivant l'augmentation de l'absorption, résultat de la formation du complexe de Cu^{2+}).

L'étude de la dissociation des complexes de Mn^{2+} en présence de Cu^{2+} s'est avérée trop rapide pour être suivie par les méthodes de spectrophotométrie classiques, elle a donc été effectuée par spectrophotométrie «stopped-flow», à différents pH et en présence de 10 à 40 excès de Cu^{2+} afin d'assurer des conditions de pseudo-premier ordre. Le schéma général du mécanisme de dissociation des complexes de Mn^{2+} peut être présentée comme montré **figure 6.6**, en prenant le Cu^{2+} pour la transmétallation comme exemple.

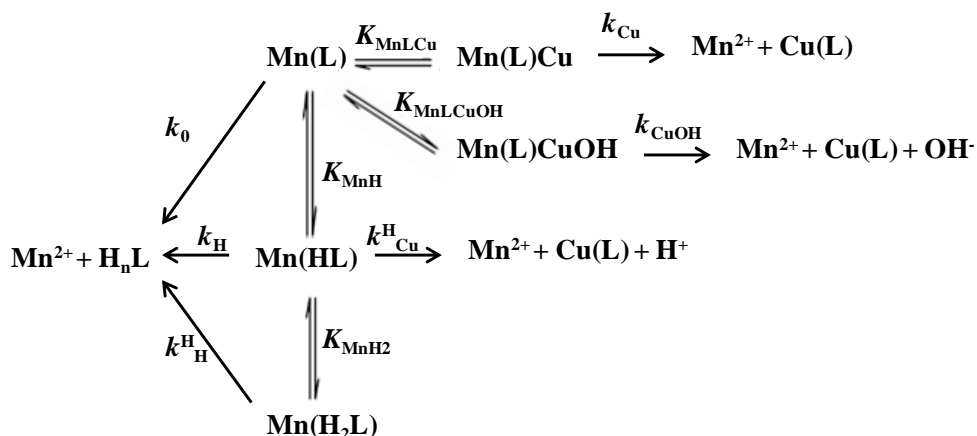


Figure 6.6: Mécanisme proposé pour la dissociation des complexes de Mn^{2+} .

Chapitre 6

La constante de vitesse de réaction peut être exprimée comme dans l'équation 6.4 où k_{obs} correspond à la constante de vitesse de pseudo-premier ordre, et $[MnL]_{tot}$ est la concentration totale de MnL.

$$\frac{-d[MnL]_t}{dt} = k_{obs}[MnL]_{tot} \quad (6.4)$$

En tenant compte des différentes voies de dissociations (caractérisées par les constantes de vitesse k_0 , k_H , k_H^H , k_{Cu} et k_{Cu}^H , figure 6.6), et des équations des constantes de protonation et de stabilité des intermédiaires formés lors de la réaction (K_{MnHL} , K_{MnH2L} , K_{MnLCu} , et K_{CuOH}), la constante de vitesse de pseudo-premier ordre (k_{obs}) peut être exprimée comme dans l'équation 6.5. Cette équation est générale pour décrire la constante de vitesse d'échange du métal dans le cas des réactions de dissociation des complexes de Mn^{2+} .

$$k_{obs} = \frac{k_0 + k_1[H^+] + k_2[H^+]^2 + k_3[Cu^{2+}] + k_4[Cu^{2+}][H^+] + k_5[Cu^{2+}][OH^-]}{1 + K_{MnHL}[H^+] + K_{MnHL}K_{MnH2L}[H^+]^2 + K_{MnLCu}[Cu^{2+}]} \quad (6.5)$$

(avec $K_{MnHL} = [Mn(HL)]/[Mn(L)][H^+]$, $K_{MnH2L} = [Mn(H2L)]/[Mn(HL)][H^+]$, $K_{MnLCu} = [Mn(L)Cu]/[Mn(L)][Cu]$, $k_1 = k_H \cdot K_{MnHL}$, $k_2 = k_H^H \cdot K_{MnHL} \cdot K_{MnH2L}$, $k_3 = k_{Cu} \cdot K_{MnLCu}$, $k_4 = k_{Cu}^H \cdot K_{MnHL}$ et $k_5 = k_{CuOH} \cdot K_{CuOH}$).

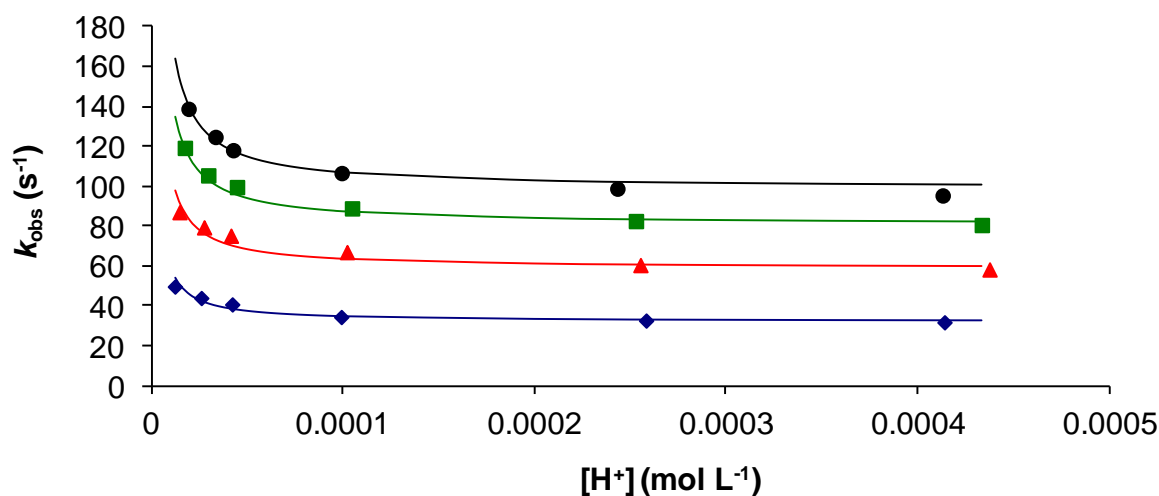


Figure 6.7: Dépendance de la constante de pseudo-premier ordre, k_{obs} , en fonction de la concentration en Cu^{2+} et H^+ pour le complexe $[MnL_5]^{2-}$. L'excès de Cu^{2+} utilisé était x10(◆), x20(▲), x30(■), x40(●).

Étude de stabilité thermodynamique et inertie cinétique de complexes de Mn^{2+}

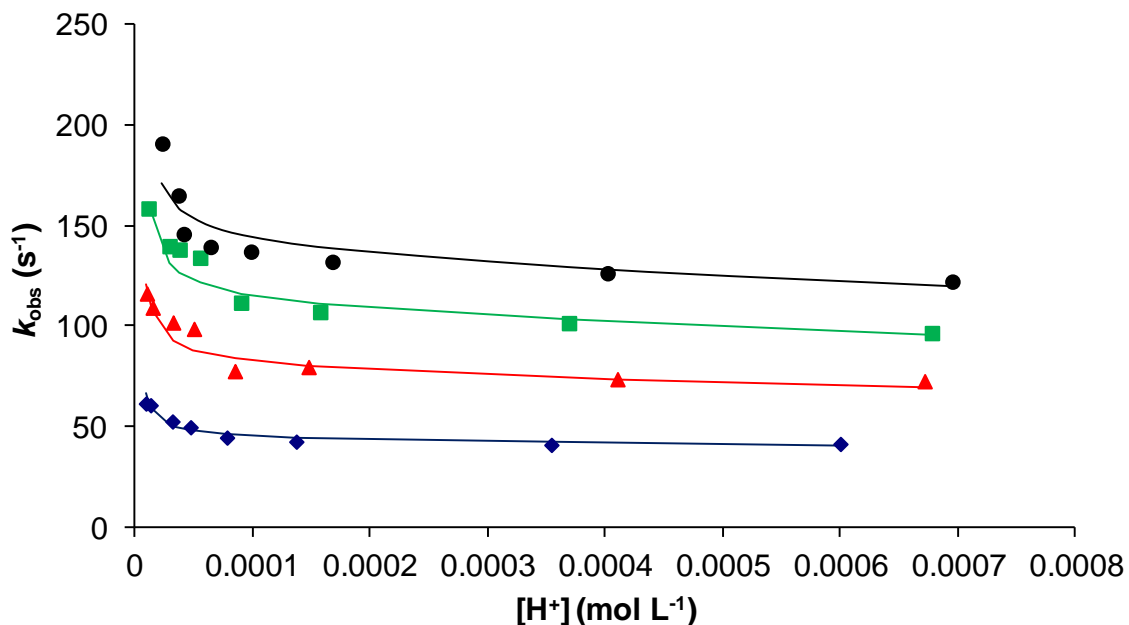


Figure 6.8 : Dépendance de la constante de pseudo- premier ordre, k_{obs} , en fonction de la concentration en Cu^{2+} et H^+ pour le complexe $[MnL_6]^{2-}$. L'excès de Cu^{2+} utilisé était $\times 10$ (◆), $\times 20$ (▲), $\times 30$ (■), $\times 40$ (●).

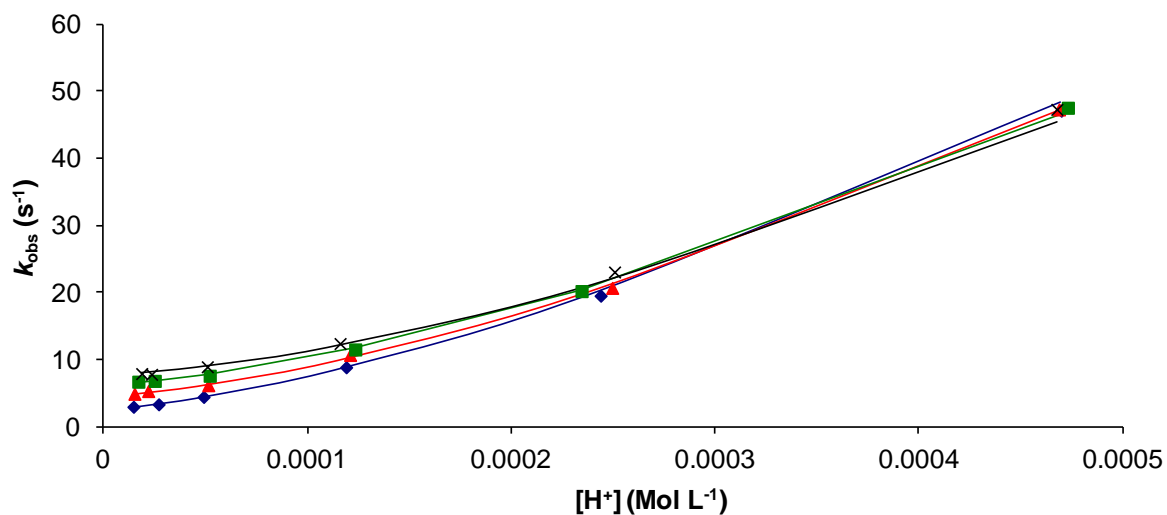


Figure 6.9 : Dépendance de la constante de pseudo- premier ordre, k_{obs} , en fonction de la concentration en Cu^{2+} et H^+ pour le complexe $[MnL_7]$. L'excès de Cu^{2+} utilisé était $\times 10$ (◆), $\times 20$ (▲), $\times 30$ (■), $\times 40$ (□).

Tableau 6.3 : Constantes de vitesse caractérisant la dissociation des complexes de Mn²⁺ (25°C)

	k_1 (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_2 (M ⁻² s ⁻¹)	k_3 (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_5 (M ⁻² s ⁻¹)	K_{MLCu}	$t_{1/2}^a$ (s)
L₅	-	-	$(1.45 \pm 0.04) \times 10^4$	$(1.17 \pm 0.07) \times 10^{13}$	45 ± 5	0.024
L₆	-	-	$(1.7 \pm 0.1) \times 10^4$	$(3.3 \pm 0.5) \times 10^{10}$	20 ± 10	2.75
L₇	$(3.1 \pm 0.3) \times 10^4$	$(5.6 \pm 0.2) \times 10^8$	$(1.13 \pm 0.05) \times 10^3$	-	41 ± 6	55
EDTA^b	$(5.2 \pm 0.1) \times 10^2$	$(2.3 \pm 0.3) \times 10^8$	45 ± 8	-		274

a : calculé pour pH=7.4 et [Cu²⁺]=1×10⁻⁵ M, b : référence [13]

Lors des analyses, les valeurs de constante de dissociation spontanées (k_0) se sont avérées négligeables, pour chacun des trois complexes rapportés. En effet, lors de l'ajustement des courbes à l'équation 6.5, les valeurs de k_0 obtenues se sont avérées très faibles avec une erreur supérieure à la valeur absolue. Par conséquent, pour l'ajustement final des données, k_0 a été fixé à 0 et les autres constantes ont été calculées.

Dans le cas du complexe [MnL₇]⁻, la constante de vitesse de pseudo-premier ordre k_{obs} , qui caractérise la dissociation des complexes de Mn²⁺, augmente avec la concentration en ion [H⁺] (k_1 et k_2) mais n'est que légèrement affectée par la concentration en ion Cu²⁺ (k_3) (figure 6.9). La voie de dissociation catalysée par les ions H⁺ est donc le mécanisme le plus efficace dans le cas de ce complexe. Ceci n'est pas surprenant étant donné que le ligand H₄L₇ possède un atome donneur de moins que les autres et est censé former des intermédiaires dinucléaires peu stables (voire ne pas du tout en former). En contraste, les complexes [MnL₅]²⁻ et [MnL₆]²⁻ tendent tous deux à se dissocier en présence de l'ion Cu²⁺ (dissociation caractérisée par la constante de vitesse k_3). Il n'a pas été possible de déterminer la constante de vitesse caractérisant la dissociation catalysée par H⁺ (k_1) dans la gamme de pH étudiée, puisque k_{obs} ne montre pas de dépendance en fonction de [H⁺] en solutions acides (figures 6.7 et 6.8). Ce comportement est certainement le résultat de la formation d'un intermédiaire dinucléaire très stable (souvent référencé dans la littérature comme un complexe « dead-end ») empêchant le mécanisme de dissociation assisté par H⁺ d'avoir lieu. En d'autres termes, la dissociation de ces complexes a principalement lieu par attaque directe de l'ion métallique compétiteur, de ce fait, la

compétition existante entre les différentes voies de dissociation est fortement déplacée vers un mécanisme de transmétallation.

Pour les complexes $[MnL_5]^{2-}$ et $[MnL_6]^{2-}$ (figures 6.7 et 6.8), une légère augmentation des valeurs de k_{obs} est observée pour les pH les plus élevés. Ceci est vraisemblablement l'effet du complexe de $Cu(OH)^+$ qui est connu pour attaquer les complexes de manganèse de manière plus efficace (environ 100 fois plus) que l'ion Cu^{2+} , comme cela a déjà été montré dans le cas de complexes similaires [18]. Cette meilleure efficacité de réaction de $Cu(OH)^+$ est due à la formation de liaisons hydrogène ou de pont hydroxydes stabilisant l'intermédiaire formé [18]. La présence de différentes voies de dissociation (caractérisées par leurs constantes de vitesse correspondantes), rend la comparaison directe de l'inertie cinétique des différents complexes de Mn^{2+} difficile. Pour cela, les temps de demi-vie ($t_{1/2}$) des réactions de dissociation ont été calculés pour des conditions physiologiques (pH = 7.4 et pour une concentration en ion compétiteur Cu^{2+} telle que $c_{Cu^{2+}}=1 \times 10^{-5}$ M) (tableau 6.3). Ces données montrent clairement que l'inertie cinétique des complexes de Mn^{2+} présentés est bien inférieure à celle du complexe $[MnEDTA]^{2-}$, dû aux valeurs k_3 qui sont de deux ordres de grandeur plus élevées dans le cas de $[MnL_5]^{2-}$ et $[MnL_6]^{2-}$. Bien que la dissociation catalysée par les protons soit plus importante pour $[MnEDTA]^{2-}$ que pour $[MnL_5]^{2-}$ et $[MnL_6]^{2-}$, à pH physiologique elle ne compense pas cette différence et le complexe $[MnEDTA]^{2-}$ a un temps de demi-vie de dissociation qui reste 2 à 4 ordres de grandeur plus grand que ceux du $[MnL_5]^{2-}$ et du $[MnL_6]^{2-}$. Il est alors attendu que ces derniers complexes se dissocient en milieu biologique, ils ne peuvent donc pas être proposés pour une utilisation *in-vivo*. Il est néanmoins important de souligner que les temps de demi-vie ($t_{1/2}$) déterminés pour $[MnL_5]^{2-}$ et $[MnL_6]^{2-}$ ont été calculés en utilisant uniquement les données de dissociation catalysées par le Cu^{2+} , étant donné que les données correspondantes au processus de dissociation catalysé par H^+ ne sont pas déterminables.

6.4. Propriétés de relaxation

6.4.1. Mesures de relaxivité des complexes $[MnL_6]^{2-}$ et $[MnL_7]^-$

L'efficacité des complexes paramagnétiques en tant qu'agents de contraste pour l'IRM est communément décrite par leur relaxivité r_1 . Celle-ci est définie comme étant l'augmentation paramagnétique du temps de relaxation longitudinale des protons de l'eau pour une concentration en agent de contraste de 1mM.

Chapitre 6

La relaxivité du proton des complexes $[\text{MnL}_6]^{2-}$ et $[\text{MnL}_7]^-$, mesurées à 25°C et 20 MHz sont reportées et comparées à celle de $[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$ et de $[\text{Mn}(\text{AAZTA})]^{2-}$ (tableau 6.4).

Tableau 6.4 : Relaxivités des complexes de Mn^{2+} , 20MHz, 25°C

	$[\text{Mn}(\text{L}_6)]^{2-}$	$[\text{Mn}(\text{L}_7)]^-$	$[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$	$[\text{Mn}(\text{AAZTA})]^{2-}$
r_1 ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)	1.51	2.64	3.2 ¹³	1.6 ¹⁴

En accord avec ces résultats, nous pouvons conclure que le complexe $[\text{MnL}_6]^{2-}$ ne possède pas de molécule d'eau directement coordonnée au centre métallique Mn^{2+} , étant donné que sa relaxivité est similaire à celle du complexe $[\text{MnAAZTA}]^{2-}$ qui présente $q=0$. Néanmoins, le complexe $[\text{MnL}_7]^-$ présente une relaxivité plus élevée que celle de $[\text{MnL}_6]^{2-}$ et proche de celle décrite pour $[\text{MnEDTA}]^{2-}$ qui est connu pour former un complexe monohydraté. Ces résultats montrent que la perte d'un bras de complexation dans la structure de $[\text{MnL}_7]^-$ permet l'obtention d'un complexe monohydraté, nécessaire pour une application en IRM *in-vivo*. Les propriétés de relaxivité du complexe $[\text{MnL}_7]^-$ ont alors été étudiées de manière plus détaillée.

6.4.2. Mesures de RMN de ^{17}O et de NMRD ^1H sur le complexe $[\text{MnL}_7]^-$

Les profils NMRD ^1H (Dispersion de la Relaxation Magnétique Nucléaire), qui représentent la dépendance de la relaxivité des protons au champ magnétique, sont largement utilisés pour la caractérisation de potentiels agents de contrastes pour l'IRM. L'allure des profils NMRD ^1H dépend de l'ensemble des paramètres qui déterminent la relaxivité et peut aider à identifier les mécanismes de relaxation impliqués. De plus, le temps de relaxation transversale (T_2) de ^{17}O ainsi que les déplacements chimiques (ω) sont souvent mesurés en fonction de la température pour déterminer indépendamment certains paramètres influençant la relaxivité. Les valeurs T_2 de ^{17}O donnent un accès direct à la vitesse d'échange de la molécule d'eau coordonnée (k_{ex} , ou le temps de résidence de la molécule d'eau $\tau_M = 1/k_{\text{ex}}$) et les déplacements chimiques de ^{17}O sont liés à l'état d'hydratation du complexe. Les temps de relaxation transversale de ^{17}O et les déplacements chimiques mesurés pour $[\text{MnL}_7]^-$ en fonction de la température à 9.4 T sont représentés en **figures 6.10 et 6.11**.

Etude de stabilité thermodynamique et inertie cinétique de complexes de Mn^{2+}

Les temps de relaxation longitudinale ont également été mesurés ; néanmoins, ces valeurs n'ont pas été prises en compte dans l'ajustement des données étant donné que la différence entre les valeurs obtenues pour les solutions contenant le complexe de Mn^{2+} ou la référence s'est avérée très faible (~3–5 %).

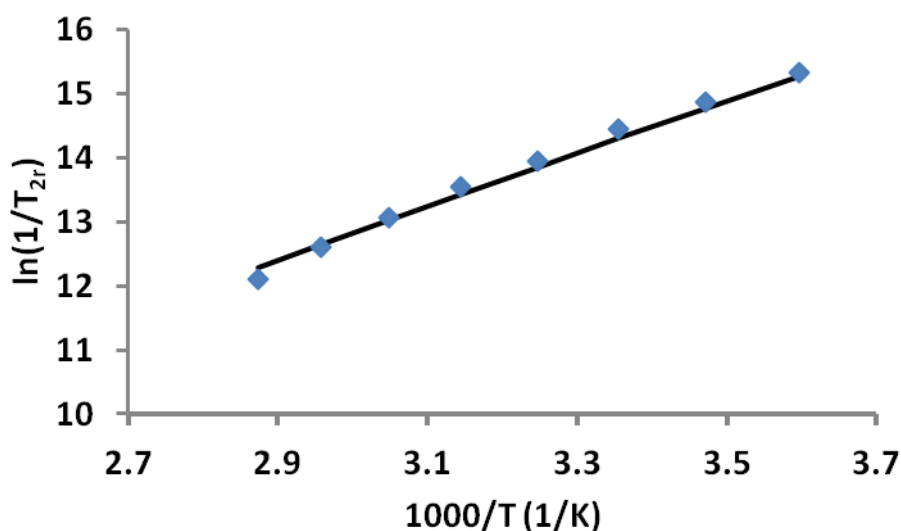


Figure 6.10 : dépendance en température de la vitesse de relaxation transversale réduite de l' ^{17}O du complexe $[MnL_7]^-$ à 9.4 T.

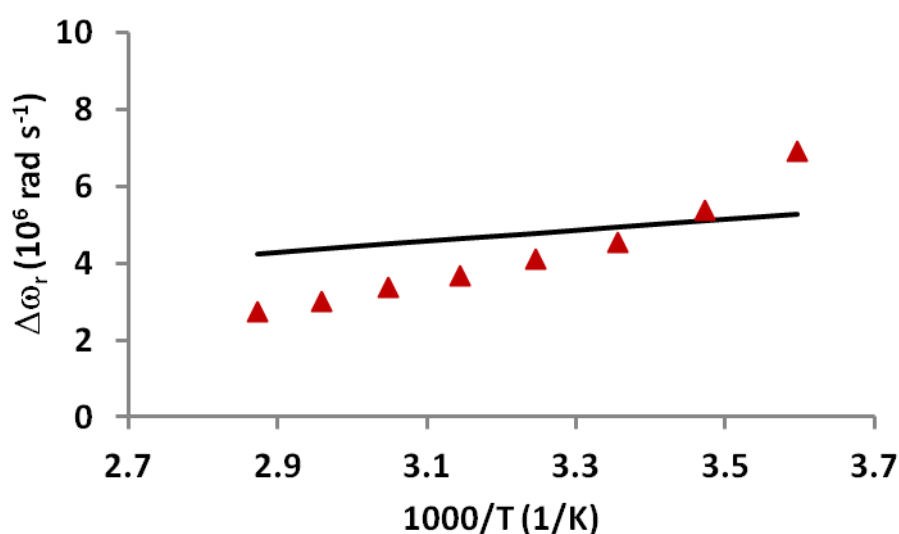


Figure 6.11 : dépendance en température du déplacement chimique paramagnétique réduit de l' ^{17}O du complexe $[MnL_7]^-$ à 9.4 T.

Chapitre 6

Sur la base de la structure de l'unité chélatante du ligand, il est cohérent d'admettre que le complexe $[\text{MnL}_7]^-$ possède un mode de coordination hexadentate avec une molécule d'eau dans sa sphère de coordination interne. Les déplacements chimiques d' ^{17}O mesurés pour $[\text{MnL}_7]^-$ sont en accord avec cette hypothèse admettant un système monohydraté. En effet, les déplacements chimiques ont pu être ajustés avec une constante de couplage scalaire ($A_{\text{O}}/\hbar = 40 \times 10^6 \text{ rad s}^{-1}$), typique d'un complexe de Mn^{2+} (**Figure 6.11**).

La dépendance en température de la vitesse de relaxation transversale réduite de ^{17}O indique que l'échange de la molécule d'eau a lieu dans un régime d'échange rapide pour $[\text{MnL}_7]^-$. La constante de vitesse d'échange (k_{ex}) a été calculée par ajustement des données des vitesses de relaxation transversale de ^{17}O aux équations de la théorie de relaxation paramagnétique de Solomon-Bloembergen-Morgan. La relaxation du spin électronique a été décrite par une fonction exponentielle. Les équations utilisées sont données en Annexe.

La valeur de constante de vitesse d'échange d'eau est très élevée, par conséquent, l'ajustement des données d' ^{17}O $\ln(1/T_{2r})$ ne permet pas la détermination des paramètres décrivant la relaxation du spin électronique car la contribution de la vitesse de relaxation électronique, $1/T_{1e}$ est négligeable dans l'expression du temps de corrélation qui module la relaxation transversale de ^{17}O , $1/\tau_s = 1/T_{1e} + k_{\text{ex}}$. En effet, en fixant le paramètre $1/T_{1e}^{298}$ à des valeurs comprises entre $5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ et $1 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$, on obtient invariablement une valeur de $k_{\text{ex}}^{298} = (2.8 \pm 0.6) \times 10^9 \text{ s}^{-1}$. Cette constante de vitesse d'échange d'eau fait partie des valeurs les plus élevées obtenues pour des complexes de Mn^{2+} ; elle est comparable à celles rapportées pour les complexes $[\text{Mn}(\text{NTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ ($k_{\text{ex}}^{298} = 1.5 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$), **[19]** et $[\text{Mn}(1,4\text{-DO2A})]$ (**Tableau 6.5**). Cet échange d'eau extrêmement rapide entre la première sphère de coordination et le solvant est probablement lié à la flexibilité de la sphère de coordination autour de l'ion métallique. De manière intéressante, l'entropie d'activation a une valeur positive élevée, suggérant un mécanisme d'échange d'eau fortement dissociatif. On note néanmoins que l'attribution exacte du mécanisme d'échange d'eau ne peut pas se faire uniquement sur la base de la valeur de l'entropie d'activation qui comporte toujours une erreur considérable, mais il faudrait faire des mesures de $1/T_{2r}^{17\text{O}}$ en fonction de la pression pour accéder au volume d'activation de l'échange d'eau, ΔV^\ddagger , comme cela a été fait pour certains complexes de Mn^{2+} **[20]**.

Etude de stabilité thermodynamique et inertie cinétique de complexes de Mn^{2+}

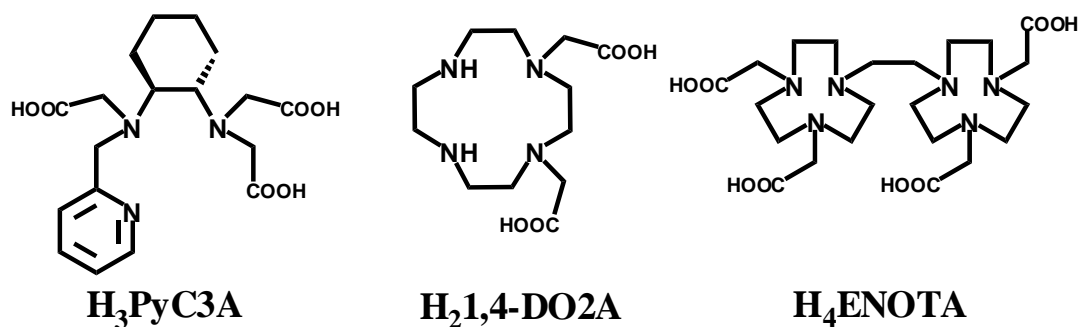


Figure 5.B.12: Structure des ligands comparés à **H₃L₇**

Tableau 6.5 : Paramètres de relaxation du complexe **[MnL₇]⁻**

	[MnL₇]⁻	[Mn(PyC3A)(H₂O)]⁻ ^a	[Mn1,4-DO2A]^b	[Mn₂ENOTA]^c	[Mn(H₂O)₆]²⁺ ^d
<i>k_{ex}</i>²⁹⁸(10⁶s⁻¹)	2800 (600)	100 (at 310 K)	1134	5.5	2.1
ΔH^\ddagger(kJ.mol⁻¹)	34(5)	37.2	29.4	20.5	32.9
ΔS^\ddagger(J.mol⁻¹.K⁻¹)	+51(15)	-	-	- 28	+ 5.7
<i>A₀</i>/h(10⁶rad.s⁻¹)	40 (5)	28.7	43	32.7	33.3

Résultats obtenus par analyse des données de RMN de ¹⁷O selon la théorie SBM

a : référence [21], b : référence [22], c : référence [23], d : référence [24]

Les profils NMRD ¹H mesurés pour le complexe **[MnL₇]⁻** à 25 et 37 °C montrent une dispersion entre 1 et 10 MHz et sont typiques de complexes paramagnétiques à faible poids moléculaire (**Figure 6.13**).

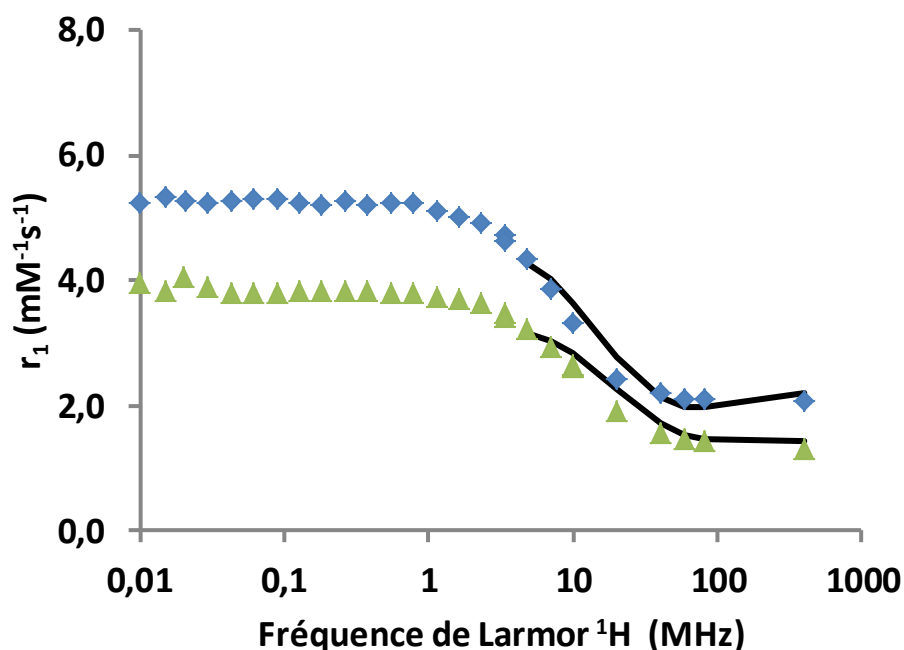


Figure 6.13: Profil NMRD ^1H du complexe $[\text{MnL}_7]^-$ à 298 K (◆) et 310 K (▲)

Ces profils ont été ajustés aux équations de la théorie de relaxation paramagnétique Solomon-Bloembergen-Morgan (équations données en Annexe). A condition de se restreindre à l'étude des champs magnétiques moyens et hauts, cette approche théorique permet d'obtenir des informations fiables sur les paramètres régulant la relaxation des complexes de petite taille et surtout sur le temps de corrélation rotationnelle [25]. Néanmoins, elle ne permet pas d'obtenir d'informations détaillées sur la relaxation du spin électronique. Ainsi, pour l'ajustement des profils NMRD ^1H de $[\text{MnL}_7]^-$, seules les valeurs de relaxivité obtenues à un champs magnétique supérieur à 6 MHz ont été utilisées et les paramètres suivants ont été déterminés : le temps de corrélation rotationnelle, τ_R^{298} , et son énergie d'activation, E_R , les paramètres électroniques Δ^2 et τ_V^{298} en fixant leur énergie d'activation E_V à 1 kJ/mol. Le coefficient de diffusion D_{MnH}^{298} , et son énergie d'activation $E_{D_{\text{MnH}}}$ ont été fixés à $26 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ et 20 kJmol^{-1} , respectivement. Les distances entre l'ion Mn^{2+} et les protons de la molécule d'eau de la sphère interne et externe ont été fixées à $r_{\text{MnH}} = 2.83 \text{ \AA}$ et $a_{\text{MnH}} = 3.6 \text{ \AA}$, respectivement. Les valeurs correspondant au meilleur ajustement sont présentées dans le **tableau 6.6**.

Tableau 6.6 : Paramètres de relaxation du complexe MnL₁₂

	[MnL ₇] ⁻	[Mn1,4-DO2A] ^a	[Mn ₂ ENOTA] ^b
<i>E_R</i> (kJ.mol ⁻¹)	20 (3)	19.1	18
<i>τ_{RH}</i> ²⁹⁸ (ps)	25 (5)	46	25.5
<i>τ_v</i> ²⁹⁸ (ps)	2 (1)	4.4	7.7
<i>Δ</i> ² (10 ²⁰ s ⁻¹)	15 (1)	0.48	4.7

Résultats obtenus par analyse des données expérimentales NMRD ¹H selon la théorie SBM
a : référence [22], b : référence [23]

La valeur obtenue pour le temps de corrélation rotationnelle, *τ_{RH}*²⁹⁸, est dans la gamme rapportée pour d'autres complexes de Mn²⁺ de cette taille et correspond à la rotation d'une petite molécule [20].

6.5. Conclusion

Nous avons reporté l'étude de trois ligands à base de pyridine pour la complexation du Mn^{2+} . Les complexes $[MnL_5]^{2-}$ et $[MnL_6]^{2-}$ ont montré une meilleure stabilité thermodynamique que le complexe $[MnL_7]^-$ et des stabilités comparables à celles décrites pour les complexes $[MnOBETA]^{2-}$ et $[MnEDTA]^{2-}$. Des études de cinétique de dissociation ont montré que le mécanisme de décomplexation du complexe $[MnL_7]^-$ a principalement lieu suivant un mécanisme catalysé par les ions H^+ . Au contraire, pour les complexes $[MnL_5]^{2-}$ et $[MnL_6]^{2-}$, la dissociation métal-assistée est la voie largement prépondérante dans la décomplexation. Sa contribution est tellement importante dans la dissociation que cela ne nous permet pas de caractériser la voie de dissociation catalysée par des protons. Cette dernière ne devrait pas avoir un poids significatif dans le comportement de ces complexes dans des conditions de pH physiologique. Les valeurs de temps de demi-vie de la dissociation, $t_{1/2}$, calculées mettent en évidence la faible inertie cinétique des complexes de Mn^{2+} étudiés, bien qu'il doive être souligné que ces valeurs ont été calculées seulement en tenant compte du mécanisme de dissociation catalysé par le Cu^{2+} . En conclusion, pour les complexes de Mn^{2+} , la présence de la pyridine dans le squelette du ligand ne conduit pas à l'inertie cinétique attendue vis-à-vis de l'EDTA ce qui empêcherait toute utilisation *in-vivo* en tant qu'agent de contraste.

Enfin, les études de relaxivité ont confirmé la présence d'une molécule d'eau dans la première sphère du $[MnL_7]^-$, en contraste aux complexes $[MnL_5]^{2-}$ et $[MnL_6]^{2-}$ non-hydratés. La vitesse d'échange d'eau, obtenue par des mesures de RMN de ^{17}O , est particulièrement élevée sur ce complexe, ce qui est certainement la conséquence d'une sphère de coordination très flexible. En effet, cet échange d'eau est parmi les plus rapides observés pour les complexes de Mn^{2+} , 1000 fois plus rapide que l'échange sur l'aqua ion $Mn(H_2O)_6^{2+}$.

6.6. Références

- (1) Brücher, E.; Tircso, G.; Baranyai, Z.; Kovacs, Z.; Sherry, A. D.: Stability and Toxicity of Contrast Agents. In *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*; John Wiley & Sons, Ltd, **2013**; pp 157.
- (2) Drahoš, B.; Lukeš, I.; Tóth, É.: Manganese(II) Complexes as Potential Contrast Agents for MRI. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2012**, 2012, 1975-1986.
- (3) Negri, R.; Baranyai, Z.; Tei, L.; Giovenzana, G. B.; Platas-Iglesias, C.; Bényei, A. C.; Bodnár, J.; Vágner, A.; Botta, M.: Lower Denticity Leading to Higher Stability: Structural and Solution Studies of Ln(III)–OBETA Complexes. *Inorganic chemistry* **2014**, 53, 12499-12511.
- (4) Molnár, E.; Camus, N.; Patinec, V.; Rolla, G. A.; Botta, M.; Tircsó, G.; Kálmán, F. K.; Fodor, T.; Tripier, R.; Platas-Iglesias, C.: Picolinate-Containing Macrocyclic Mn²⁺ Complexes as Potential MRI Contrast Agents. *Inorganic chemistry* **2014**, 53, 5136-5149.
- (5) Pan, D.; Schmieder, A. H.; Wickline, S. A.; Lanza, G. M.: Manganese-based MRI contrast agents: past, present and future. *Tetrahedron* **2011**, 67, 8431-8444.
- (6) Pan, D.; Caruthers, S. D.; Senpan, A.; Schmieder, A. H.; Wickline, S. A.; Lanza, G. M.: Revisiting an old friend: manganese-based MRI contrast agents. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology* **2011**, 3, 162-173.
- (7) Drahoš, B.; Kotek, J.; Hermann, P.; Lukeš, I.; Tóth, É.: Mn²⁺ Complexes with Pyridine-Containing 15-Membered Macrocycles: Thermodynamic, Kinetic, Crystallographic, and ¹H/¹⁷O Relaxation Studies. *Inorganic chemistry* **2010**, 49, 3224-3238.
- (8) Rodríguez-Rodríguez, A.; Garda, Z.; Ruscsak, E.; Esteban-Gomez, D.; de Blas, A.; Rodríguez-Blas, T.; Lima, L. M. P.; Beyler, M.; Tripier, R.; Tircso, G.; Platas-Iglesias, C.: Stable Mn²⁺, Cu²⁺ and Ln³⁺ complexes with cyclen-based ligands functionalized with picolinate pendant arms. *Dalton Transactions* **2015**, 44, 5017-5031.
- (9) Rodríguez-Rodríguez, A.; Esteban-Gómez, D.; Tripier, R.; Tircsó, G.; Garda, Z.; Tóth, I.; de Blas, A.; Rodríguez-Blas, T.; Platas-Iglesias, C.: Lanthanide(III) Complexes with a Reinforced Cyclam Ligand Show Unprecedented Kinetic Inertness. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, 136, 17954-17957.
- (10) Bonnet, C. S.; Buron, F.; Caillé, F.; Shade, C. M.; Drahoš, B.; Pellegatti, L.; Zhang, J.; Villette, S.; Helm, L.; Pichon, C.; Suzenet, F.; Petoud, S.; Tóth, É.: Pyridine-Based Lanthanide Complexes Combining MRI and NIR Luminescence Activities. *Chemistry – A European Journal* **2012**, 18, 1419-1431.
- (11) Pellegatti, L.; Zhang, J.; Drahoš, B.; Villette, S.; Suzenet, F.; Guillaumet, G.; Petoud, S.; Toth, E.: Pyridine-based lanthanide complexes: towards bimodal agents operating as near infrared luminescent and MRI reporters. *Chemical communications* **2008**, 6591-3.
- (12) Bonnet, C. S.; Laine, S.; Buron, F.; Tircsó, G.; Pallier, A.; Helm, L.; Suzenet, F.; Tóth, É.: A Pyridine-Based Ligand with Two Hydrazine Functions for Lanthanide Chelation: Remarkable Kinetic Inertness for a Linear, Bishydrated Complex. *Inorganic chemistry* **2015**, 54, 5991-6003.
- (13) Kálmán, F. K.; Tircsó, G.: Kinetic Inertness of the Mn²⁺ Complexes Formed with AAZTA and Some Open-Chain EDTA Derivatives. *Inorganic chemistry* **2012**, 51, 10065-10067.
- (14) Tei, L.; Gugliotta, G.; Fekete, M.; Kalman, F. K.; Botta, M.: Mn(II) complexes of novel hexadentate AAZTA-like chelators: a solution thermodynamics and relaxometric study. *Dalton Transactions* **2011**, 40, 2025-2032.
- (15) Duffield, J. R.; May, P. M.; Williams, D. R.: Computer simulation of metal ion equilibria in biofluids. IV. plutonium speciation in human blood plasma and chelation therapy using polyaminopolycarboxylic acids. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1984**, 20, 199-214.
- (16) Baranyai, Z.; Uggeri, F.; Giovenzana, G. B.; Bényei, A.; Brücher, E.; Aime, S.: Equilibrium and Kinetic Properties of the Lanthanoids(III) and Various Divalent Metal Complexes of the Heptadentate Ligand AAZTA. *Chemistry – A European Journal* **2009**, 15, 1696-1705.

Chapitre 6

- (17) Irving, H.; Williams, R. J. P.: 637. The stability of transition-metal complexes. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1953**, 3192-3210.
- (18) Steinhaus, R. K.: Substituent effects in metal-exchange reactions. 1. Exchange reaction between (ethylenediamine-N,N'-di- α -propionato)nickel(II) and copper(II). *Inorganic chemistry* **1982**, *21*, 4084-4088.
- (19) Zetter, M. S.; Grant, M. W.; Wood, E. J.; Dodgen, H. W.; Hunt, J. P.: Water-exchange studies on manganese(II) nitrilotriacetate and ethylenediaminetetraacetate complexes by oxygen-17 nuclear magnetic resonance. *Inorganic Chemistry* **1972**, *11*, 2701-2706.
- (20) Drahoš, B.; Kotek, J.; Císařová, I.; Hermann, P.; Helm, L.; Lukeš, I.; Tóth, É.: Mn²⁺ Complexes with 12-Membered Pyridine Based Macrocycles Bearing Carboxylate or Phosphonate Pendant Arm: Crystallographic, Thermodynamic, Kinetic, Redox, and ¹H/¹⁷O Relaxation Studies. *Inorganic chemistry* **2011**, *50*, 12785-12801.
- (21) Gale, E. M.; Atanasova, I. P.; Blasi, F.; Ay, I.; Caravan, P.: A Manganese Alternative to Gadolinium for MRI Contrast. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137*, 15548-15557.
- (22) Rolla, G. A.; Platas-Iglesias, C.; Botta, M.; Tei, L.; Helm, L.: ¹H and ¹⁷O NMR Relaxometric and Computational Study on Macrocyclic Mn(II) Complexes. *Inorganic Chemistry* **2013**, *52*, 3268-3279.
- (23) Balogh, E.; He, Z.; Hsieh, W.; Liu, S.; Tóth, É.: Dinuclear Complexes Formed with the Triazacyclononane Derivative ENOTA4-: High-Pressure ¹⁷O NMR Evidence of an Associative Water Exchange on [MnII₂(ENOTA)(H₂O)₂]. *Inorganic Chemistry* **2007**, *46*, 238-250.
- (24) Ducommun, Y.; Newman, K. E.; Merbach, A. E.: High-pressure oxygen-17 NMR evidence for a gradual mechanistic changeover from Ia to Id for water exchange on divalent octahedral metal ions going from manganese(II) to nickel(II). *Inorganic Chemistry* **1980**, *19*, 3696-3703.
- (25) Fries, P. H.; Belorizky, E.: Electronic relaxation of paramagnetic metal ions and NMR relaxivity in solution: Critical analysis of various approaches and application to a Gd(III)-based contrast agent. *The Journal of Chemical Physics* **2005**, *123*, 124510.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Ces travaux de thèse présentent la synthèse et/ou la caractérisation de complexes de lanthanide conçus comme de nouveaux agents de contraste IRM, ou de leur modèles, pour la détection de l'activité enzymatique. L'approche générale pour la conception de ces sondes est basée sur (i) la modulation de la relaxivité ^1H *via* la modification du nombre d'hydratation du complexe (pour Gd^{3+}) et (ii) la modification de l'effet paraCEST (pour Ln^{3+} autres que La^{3+} , Gd^{3+} ou Lu^{3+}) après l'action de l'enzyme sur l'agent de contraste.

Nous avons reporté l'étude d'une famille de complexes pour laquelle l'unité chélatante des lanthanides est couplée au substrat de l'enzyme par l'intermédiaire d'un espaceur auto-immolable. L'auto-destruction de cet espaceur, initiée par la coupure enzymatique du substrat transforme la fonction carbamate en amine entraînant des variations au niveau des propriétés de relaxivité ou paraCEST des complexes. Nous avons dans un premier temps porté notre attention sur l'étude de composés modèles contenant le bras auto-immolable benzyloxycarbamate sans substrat, modélisant l'état de l'agent de contraste avant coupure enzymatique. L'étude de l'influence de la position de ce bras sur la pyridine a permis de mettre en évidence que seules les positions 5 et 6 permettent à la fois d'observer des modifications des effets paraCEST et T_1 , entre les modèles avant et après coupure enzymatique. Ce principe a été appliqué à la détection de l'activité de la β -galactosidase, pour lequel le suivi par relaxivité de la coupure enzymatique sur le complexe de Gd^{3+} a montré l'augmentation du temps de relaxation longitudinale. Le suivi paraCEST de la coupure enzymatique sur le complexe d' Yb^{3+} a permis de mettre en évidence une sonde responsive à la fois au pH et à la présence de l'enzyme, qui peut être « on/off » ou « off/on » dépendamment du pH.

L'intérêt de telles molécules pour une utilisation *in-vivo* a été validé par des études de stabilité thermodynamique et d'inertie cinétique. La présence d'une fonction carbamate coordinante sur le complexe $[\text{Ln}(\text{DO3A-Py-Cbz}(\mathbf{6}))]$ entraîne une augmentation de la stabilité des complexes par rapport à son analogue amine $[\text{Ln}(\text{DO3A-Py-NH}_2(\mathbf{6}))]$. Cependant la fonction 2-méthyl-6-pyridinyl conduit à une diminution de la basicité des azotes macrocycliques et une diminution des constantes de stabilité de $[\text{Ln}(\text{DO3A-Py-Cbz}(\mathbf{6}))]$ et $[\text{Ln}(\text{DO3A-Py-NH}_2(\mathbf{6}))]$ comparées à celles reportées pour les complexes $[\text{Ln}(\text{DOTA})]^-$ ou $[\text{Ln}(\text{DO3A})]$. Nous avons mis en évidence que la voie catalysée par les protons est prépondérante dans le mécanisme de dissociation de ces complexes.

Conclusion et perspectives

Les temps de demi-vie de dissociation dans des conditions proches des conditions physiologiques (de l'ordre de 10^5 - 10^6 h) sont compatibles avec une utilisation en milieu biologique.

Si les paramètres qui permettent d'influencer sur la relaxivité d'un agent de contraste sont bien identifiés, l'effet CEST des complexes de Ln^{3+} reste plus difficile à prévoir. Pour cela, des efforts sont mis en œuvre pour mettre en évidence, caractériser et comparer les effets CEST de complexes de lanthanide de structure différente. Le chapitre 4 a mis l'accent sur une famille de composés où le groupement benzyloxycarbamate laisse place à un groupement benzylamide, substitué en position 6 de la pyridine. Les effets CEST générés par les différents complexes de lanthanide utilisés n'ont pas montré de différence significative en termes de déplacement chimique par rapport à leur analogue carbamate, cependant, ces derniers semblent favoriser des échanges chimiques plus rapides. Dans les deux cas (carbamate et amide), les complexes d' Yb^{3+} montrent l'effet le plus intense au regard des autres complexes de lanthanide étudiés. Il serait intéressant d'étendre cette étude à d'autres familles moléculaires afin de compléter ces observations quant-à l'influence de la structure chimique du complexe, le choix du lanthanide utilisé et les valeurs de constante de vitesse d'échange sur les propriétés paraCEST.

La synthèse sur support solide de deux ligands substrats de l'urokinase et de la caspase 3 a été reportée. Sur ces composés, le substrat enzymatique est couplé au complexe métallique par le biais d'un espaceur propyle au travers d'une liaison amide. Ces molécules sont conçues de sorte que la coupure enzymatique du substrat au niveau du lien amide puisse entraîner la formation d'une fonction amine (modification des propriétés CEST) et la perte de la coordination des chaînes latérales du peptide sur l'ion métallique (modification des propriétés de relaxivité). La molécule modélisant l'état après coupure enzymatique a également été synthétisée. Bien que les différents complexes de lanthanide étudiés n'aient pas permis d'observer d'effets CEST satisfaisants, les complexes de Gd^{3+} d' Eu^{3+} étudiés ont montré au travers des mesures de relaxivité et de luminescence des différences de nombre d'hydratation des complexes entre les modèles de l'état avant et après coupure enzymatique. Néanmoins le positionnement du substrat sur le complexe n'a pas permis la coupure enzymatique.

Depuis ces dernières années, les complexes de Mn^{2+} sont de plus en plus étudiés comme alternatives à ceux du Gd^{3+} dans le cadre de la conception d'agents de contraste T_1 pour l'IRM.

Conclusion et perspectives

Trois ligands comportant un noyau pyridine, connus pour former des complexes relativement stables avec les lanthanides ont été étudiés pour la complexation du Mn^{2+} . Le complexe $[\text{MnL}_7]^-$ présente les meilleures propriétés de relaxivité au regard des deux autres complexes étudiés puisqu'il est le seul à posséder une molécule d'eau coordonnée. La constante de vitesse d'échange ($k_{\text{ex}}^{298} = 2800 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$) déterminée par RMN de ^{17}O pour ce complexe fait partie des valeurs les plus élevées reportées pour les complexes de Mn^{2+} .

Cependant la faible inertie cinétique (temps de demi-vie de dissociation, $t_{1/2} = 55 \text{ s}$, dans des conditions proches des conditions physiologiques) ne permet pas d'envisager l'application *in-vivo* de ce composé.

Parmi tous les composés étudiés, les complexes **Gd(DO3A-Py-Gal(5))** et **Yb(DO3A-Py-Gal(5))** possèdent les propriétés les plus prometteuses en tant qu'agents de contraste IRM pour la détection de la β -galactosidase. Cette étude constitue, à notre connaissance, le premier exemple de détection de l'activité enzymatique reporté à la fois en T_1 et en paraCEST. Cette plateforme moléculaire pourra dans le futur être étendue pour la détection d'autres enzymes, de plus, des applications *in-vivo* sont envisagées.

Partie Expérimentale

Partie expérimentale

Table des matières

7.1. Experimental procedures to Chapter 2	226
7.1.1.Synthesis.....	226
7.1.2.NMR measurements.....	226
7.1.3. ¹ H NMRD measurements.....	226
7.1.4.Luminescence measurements.....	227
7.1.5.Enzymatic kinetic assays.....	227
7.2. Experimental procedures to Chapter 3	228
7.2.1.Synthesis.....	228
7.2.2.pH-potentiometric measurements.....	228
7.2.3.UV-visible spectroscopy	229
7.2.4. ¹ H relaxometry.....	230
7.3. Experimental procedures to Chapter 4	231
7.3.1.Synthesis.....	231
7.3.2.NMR experiments.....	231
7.3.3. ¹ H NMRD measurements.....	231
7.3.4.Luminescence measurements.....	232
7.4. Experimental procedures to Chapter 5	233
7.4.1.Synthesis.....	233
7.4.1.1.General informations.....	233
7.4.1.2.Synthesis procedures.....	233
7.4.1.3.General procedure for complexes preparation.....	249
7.4.2. ¹ H NMRD Measurements.....	249
7.4.3.Luminescence lifetime measurements.....	249
7.4.4.NMR measurements.....	250
7.4.5.Relaxometric enzymatic assays.....	250
7.4.6.Luminescence enzymatic assays.....	251
7.5. Experimental procedures to Chapter 6	251
7.5.1.Synthesis.....	251
7.5.2.pH-potentiometric measurements.....	251
7.5.3. ¹ H relaxometry.....	252
7.5.4.UV-visible spectroscopy.....	252
7.5.5. ¹⁷ O NMR measurements.....	253
7.6. References	254

Ce chapitre rassemble les procédures expérimentales, les méthodes ainsi que le matériel utilisé qui ont permis de mener aux résultats présentés dans ce manuscrit. Ce chapitre a été entièrement rédigé en anglais afin de faciliter l'accessibilité et la reproduction de ces méthodes pour le plus grand nombre.

This chapter is written in English to provide a larger accessibility of the presented materials and methods used to carry out the experiments presented in this work.

7.1. Experimental procedures to Chapter 2

7.1.1. Synthesis

The complexes of interest in this chapter have been synthesized and analytically characterized in the laboratory of “Institut de Chimie des Substances Naturelles” (ICSN) in Gif-sur-Yvette under the supervision of Dr. Philippe Durand. LC/MS spectra of the complexes are given in Annexe.

7.1.2. NMR measurements

^1H NMR spectra and paraCEST measurements of the studied complexes were recorded at 400 MHz on a Bruker Advance Spectrometer using a 5 mm BBFO probe. 2D ^1H COSY NMR spectrum was recorded in H_2O solvent at 600 MHz on a Bruker Advance III HD Spectrometer using a 5 mm BBFO probe. ^1H NMR spectra were recorded in water whereas paraCEST measurements were performed in water/ D_2O (95/5 (v/v)). CEST spectra were recorded using a pre-saturation pulse of 3s at 25 μT (10 mW). Spectra were obtained by recording the bulk water signal intensity as a function of the saturation frequency in a window scale of 300 ppm saturating at each 0.5 ppm. The QUESP (quantification of the exchange rate by modulating the saturation power) experiments were recorded by varying the saturation power between 0.18 and 76 μT (0.07 and 30 mW) and keeping a constant saturation time of 3s. The QUESP measurements were performed at different pH values: 7.04, 7.35, 7.48, 7.60, 7.76, 7.98, 8.52 for **Yb(DO3A-Py-Cbz(5))** and 5.91, 6.20, 6.53, 6.84, 7.08, 7.30, 7.64 for **Yb(DO3A-Py-NH₂(5))**. pH values were adjusted by adding small amounts of diluted KOH or by using HCl vapor. The concentration of the samples was 15.6 mM and 18.3 mM for **Yb(DO3A-Py-Cbz(5))** and **Yb(DO3A-Py-NH₂(5))**, respectively.

7.1.3. ^1H NMRD measurements

Proton NMRD measurements were performed on a Stelar SMARTracer Fast Field Cycling relaxometer (0.01-10 MHz) and a Bruker WP80 NMR electromagnet adapted to variable field measurements (20-80 MHz) and controlled by a SMARTracer PC-NMR console. The temperature was monitored by a VTC91 temperature control unit and maintained by a gas flow. The temperature was determined by previous calibration with a Pt resistance temperature probe. $1/T_1$ longitudinal relaxation rates were determined for **Gd(DO3A-Py-Cbz(5))** and **Gd(DO3A-**

Partie expérimentale

Py-NH₂(5)) at the following conditions: [**Gd(DO3A-Py-Cbz(5))**]=5.51 mM, [**Gd(DO3A-Py-NH₂(5))**] =5.08 mM, pH 7.4 and different temperatures (298 K, 310 K, and 323 K).

7.1.4. Luminescence measurements

The luminescence lifetime of the europium complexes were obtained on an Agilent Cary Eclipse Fluorescence spectrophotometer by recording the decay of the emission intensity at 616 nm, following the excitation of the pyridyl moiety at 290 nm. Measurements were performed in both H₂O and D₂O solutions at pH/pD of 7.4 for the following concentrations: [**Eu(DO3A-Py-Cbz(5))**] =1.2 mM and [**Eu(DO3A-Py-NH₂(5))**] =0.81 mM. The settings were as follows: gate time: 0.05 ms; delay time: 0.1 ms; total decay time : 10 ms; 100 cycles. At least three decay curves were collected for each sample; all lifetimes were analyzed as monoexponential decays. The reported lifetimes are an average of at least three successful measurements.

7.1.5. Enzymatic kinetic assays

β -galactosidase from *E. Coli* grade VIII was purchased from Sigma (ref. G-5635). The lyophilized powder contains 667 units/mg of solid and 855 units/mg of protein.

ParaCEST enzymatic assays were monitored for **Yb(DO3A-Py-Gal(5))** in 50 mM phosphate buffer (prepared from 0.1 M Na₂HPO₄ + 0.1 M KH₂PO₄) containing 7 mg/mL of BSA and 5% D₂O at two different pH values: 7.5 and 6.2. The concentrations of the complex in the tubes were 19.9 mM for **Yb(DO3A-Py-Gal(5))** at pH 7.5 and 20.9 mM for **Yb(DO3A-Py-Gal(5))** at pH 6.2. 15 U of β -galactosidase enzyme were added to the complex solutions.

ParaCEST kinetic measurements were recorded every 4 min by measuring the evolution of the CEST effect in a window of 80ppm saturating at each 5 ppm with a saturation delay of 3s and a saturation power of 25 μ T (10 mW) at 310 K. The maximum of the CEST signal was plotted as a function of time and the resulting curves were fitted as monoexponential functions using Origin[®].

Partie expérimentale

Relaxivity enzymatic assays were monitored for **Gd(DO3A-Py-Gal(5))** in 50 mM phosphate buffer containing 7 mg/mL of BSA and 5% D₂O at pH 7.5. The concentration of the complex in the 5 mm NMR tube was 1.49 mM. 6 U of β -galactosidase enzyme were added to the complex solution. Relaxometric measurements at 20MHz and 310K were performed every 4 min. The evolution of T₁ was plotted as a function of time and the resulting curve was fitted as monoexponential function using Origin[®].

7.2. Experimental procedures to Chapter 3

7.2.1. Synthesis

Synthesis of ligands **DO3A-Py-Cbz(6)** and **DO3A-Py-NH₂(6)** were performed at the Institut de Chimie des Substance Naturelles (CNRS, Gif-sur-Yvette) under the supervision of Dr. Philippe Durand according to the already published procedure [1].

7.2.2. pH-potentiometric measurements

Potentiometric titrations were performed in order to determine protonation constants for the ligands (**DO3A-Py-Cbz(6)** and **DO3A-Py-NH₂(6)**) and stability constants of the complexes formed with the Zn²⁺, Cu²⁺, Mg²⁺ and Ca²⁺ metal ions at different metal to ligand ratios (1:1 and 2:1). Titrations were carried out by employing a Metrohm 888 Titrando automatic titration system combined with a Metrohm combined electrode in a cell thermostated at 25 °C. The titrations were carried out at an ionic strength of 0.15 M (NaCl) with NaOH solution (~0.2 M) added to a ~2 mM ML solution in 6 mL total volume. The cell content was stirred by using a magnetic stirrer and N₂ (g) was bubbled through to insure inert atmosphere. Titrations were performed in 2-12 pH range or until metal hydroxide precipitation occurred (in the samples with metal excess). Extra volume of HCl was added to the starting solution to obtain a pH starting value of 2. H⁺ ion concentrations were obtained through the measured pH using the calculation method proposed by *Irving et al* [2].

Owing to the relatively slow complexation between macrocyclic ligands and Ln³⁺ ions, the “out-of-cell” technique was used to determine stability and protonation constants of [Ln(DO3A-Py-Cbz(6))] and [Ln(DO3A-Py-NH₂(6))].

Partie expérimentale

Thirteen samples of 1.5 mL total volume were prepared containing known ligand and Ln^{3+} concentrations ($[\text{Gd}(\text{DO3A-Py-Cbz}(\mathbf{6}))]=1.95$ mM, $[\text{Ce}(\text{DO3A-Py-Cbz}(\mathbf{6}))]=1.92$ mM, $[\text{Yb}(\text{DO3A-Py-Cbz}(\mathbf{6}))]=1.95$ mM, $[\text{Gd}(\text{DO3A-Py-NH}_2(\mathbf{6}))]=1.91$ mM, $[\text{Ce}(\text{DO3A-Py-NH}_2(\mathbf{6}))]=1.88$ mM, $[\text{Yb}(\text{DO3A-Py-NH}_2(\mathbf{6}))]=1.91$ mM). The pHs of the samples were adjusted by HCl or NaOH (approximately 0.2 M) solutions to set the pH into the range where complexation is expected to take place. The samples were sealed under nitrogen gas and incubated at 25 °C until equilibrium (6-7 months for **DO3A-Py-Cbz(6)** and 3-4 weeks for **DO3A-Py-NH₂(6)**) (the time required to reach equilibrium was estimated by using ^1H -relaxometry prepared in duplicates). Samples were then opened and pH values were measured using a pH-meter equipped with a Metrohm combined electrode.

The PESQUAD program was used for the calculation of the equilibrium constants.

7.2.3. UV-visible spectroscopy

For the stability constants of the $[\text{Cu}(\text{DO3A-Py-Cbz}(\mathbf{6}))]^-$ and $[\text{Cu}(\text{DO3A-Py-NH}_2(\mathbf{6}))]^-$ complexes, UV-visible absorption spectra were recorded on a Cary 1E UV-vis instrument spectrometer in the region $\lambda=350\text{-}875$ nm at 25 °C. Out-off-cell samples were prepared containing about 2 mM complex solution, 0.15 M NaCl and different pH varying between 6.06 and 2.52 for $[\text{Cu}(\text{DO3A-Py-Cbz}(\mathbf{6}))]^-$ and between 11.57 and 2.52 mM for $[\text{Cu}(\text{DO3A-Py-NH}_2(\mathbf{6}))]^-$.

Proton-assisted dissociation kinetics was studied under pseudo-first-order conditions in acidic solutions (0.1-0.3 M HCl) at 25°C and using 1 M NaCl ionic strength in samples where the concentration of complexes was 0.247 mM ($[\text{Gd}(\text{DO3A-Py-NH}_2(\mathbf{6}))]$), 0.250 mM ($[\text{Yb}(\text{DO3A-Py-NH}_2(\mathbf{6}))]$), and 0.233 mM ($[\text{Ce}(\text{DO3A-Py-NH}_2(\mathbf{6}))]$). Under these conditions the complexes are not stable and dissociate fully. The decrease in absorbance was measured periodically at 305 nm.

Cu^{2+} -catalyzed dissociation kinetics studies of $[\text{Ce}(\text{DO3A-Py-NH}_2(\mathbf{6}))]$ was performed using standard UV-spectrophotometric method. Samples were prepared at different pH values (by varying the pH in the range of 3.45 and 4.73) by using N-methylpiperazine (NMP, 50 mM) buffer. Complex concentration was 0.15 mM, while the concentration of the Cu^{2+} was 30 times higher in order to ensure pseudo-first-order conditions. Constant ionic strength of 0.15 M NaCl was used in each sample and the temperature was maintained constant at 25 °C.

Partie expérimentale

The pseudo-first-order rate constants (k_{obs}) were calculated by fitting the absorbance-time data to the following equation:

$$A_t = (A_0 - A_e)e^{-k_{\text{obs}} t} + A_e$$

Here A_t , A_0 and A_e are the absorbances at time t , at the start and at the equilibrium of the reactions, respectively. The calculations were performed with the computer program Scientist, by using a standard least-squares procedure.

7.2.4. ^1H relaxometry

Proton-assisted dissociation kinetics of **[Gd(DO3A-Py-Cbz(6))]** (1 mM) was investigated in acidic solutions (0.1-1.2 M HCl) at 25°C and 1 M ionic strength (NaCl). Under such acidic conditions the complex fully dissociates. The increase in relaxivity was measured periodically. Cu^{2+} catalyzed dissociation kinetics of **[Gd(DO3A-Py-NH₂(6))]** was followed by ^1H relaxometry technique, measurements were performed using a Bruker Minispec MQ-20 NMR analyzer at 20 MHz and 25 °C. Different samples of 1 mM complex concentration and 0.15 M NaCl ionic strength were used in the pH range 3.1-4.2 in 50 mM NMP buffers. The longitudinal relaxation times (T_1) were measured frequently.

For both proton-assisted and Cu-assisted dissociations, k_{obs} were calculated by fitting the relaxivity ($1/T_1$)-time data to the following equation:

$$r_{1(t)} = (r_{1(0)} - r_{1(e)})e^{-k_{\text{obs}}t} + r_{1(e)}$$

$r_{1(t)}$, $r_{1(0)}$ and $r_{1(e)}$ are the relaxivity at time t , at the start and at equilibrium of the reactions, respectively. We have to notice that relaxivity values were corrected for the diamagnetic water contribution. The pseudo-first-order rate constants (k_{obs}) were calculated with the use of Scientist computer program, by using a standard least-squares procedure.

7.3. Experimental procedures to Chapter 4

7.3.1. Synthesis

The molecules of interest in this chapter have been synthesized in the laboratory of “Institut de Chimie des Substances Naturelles” (ICSN) in Gif-sur-Yvette under the supervision of Dr. Philippe Durand. LC/MS spectra of the complexes are given in Annexe.

7.3.2. NMR experiments

^1H spectra and paraCEST measurements of the studied complexes were recorded in water/ D_2O (95/5) at 400 MHz on a Bruker Advance Spectrometer using a 5 mm BBFO probe. CEST spectra were recorded using pre-saturation pulse of 3s at 25 μT (10 mW). Spectra were obtained by recording the bulk water signal intensity as a function of the saturation frequency in a window scale of 300 ppm saturating each 0.5 ppm. The QUESP (quantification of the exchange rate by modeling the saturation power) experiments were recorded by varying the saturation power between 0.18 and 76 μT (0.07 and 30 mW) and keeping a constant saturation time of 3s. The QUEST experiments (quantification of the exchange rate by modeling the saturation time) were performed using a constant saturation power of 25 μT and different saturation time from 0.25s to 4s. The QUESP and QUEST measurements were performed at 295 K and at different pH values: 6.41, 6.83, 7.05, 7.45, 8.01 for **Tm(DO3A-Py-Am(6))**, 6.06, 6.56, 7.06, 7.52, 8.02 for **Er(DO3A-Py-Am(6))**, 6.98, 7.50, 7.95, 8.20 for **Ho(DO3A-Py-Am(6))** and 7.45, 8.08 for **Yb(DO3A-Py-Am(6))**. pH values were adjusted by adding small amounts of diluted KOH or by adding HCl vapors'. The samples' concentrations were 18.35 mM, 18.2 mM, 19.14 mM and 24.7mM for **Tm(DO3A-Py-Am(6))**, **Er(DO3A-Py-Am(6))**, **Ho(DO3A-Py-Am(6))** and **Yb(DO3A-Py-Am(6))** respectively. k_{ex} values have been determined by fitting the equations given in the text using Origin[®] software.

7.3.3. ^1H NMRD measurements

Proton NMRD measurements were performed on a Stelar SMARTracer Fast Field Cycling relaxometer (0.01-10 MHz) and a Bruker WP80 NMR electromagnet adapted to variable field measurements (20-80 MHz) and controlled by a SMARTracer PC-NMR console. The temperature was monitored by a VTC91 temperature control unit and maintained by a gas flow. The temperature was determined by previous calibration with a Pt resistance temperature probe.

Partie expérimentale

$1/T_1$ longitudinal relaxation rates were determined for **Gd(DO3A-Py-Am(6))** (6.22 mM), at pH 7.4 and different temperatures (298 K, 310 K, and 323 K).

7.3.4. Luminescence measurements

The luminescence lifetime of the europium complexes were obtained on an Agilent Cary Eclipse Fluorescence spectrophotometer by recording the decay of the emission intensity at 616 nm, following the excitation of the pyridyl moiety at 258 nm. Measurements were performed in both H₂O and D₂O solutions at pH/pD of 7.4 for the followings concentrations: [**Eu(DO3A-Py-Am(6))**] = 1.02 mM and [**Tb(DO3A-Py-Am(6))**] = 1.04 mM. The settings were as follow: gate time: 0.1 ms; delay time: 0.1 ms; total decay times: 10 ms; 100 cycles. At least three decay curves were collected for each sample; all lifetimes were analyzed as monoexponential decays. The reported lifetimes are an average of at least three successful measurements.

7.4. Experimental procedures to Chapter 5

7.4.1. Synthesis

7.4.1.1. General information

Solvents and reagents come from different suppliers such as Sigma-Aldrich, Alfa-Aesar, TCIChemicals, Fisher Scientific or CheMatech.

The synthesized compounds were analyzed systematically by ^1H and ^{13}C NMR and by High Resolution Mass Spectroscopy (HRMS). ^1H and ^{13}C spectra were recorded at 600 MHz on a Bruker Advance Spectrometer using a 5mm BBFO probe. Those analyses were performed in appropriate deuterated solvents, the chemical shift is described in ppm and multiplicity of the signal is given such as: singlet (s), doublet (d), triplet (t), quadruplet (q), multiplet (m), broad signal (bs). Coupling constants J are given in Hz.

HRMS spectra were performed by Dr. Cyril Colas at the Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA) as part of the Research Federation FR 2708 with the Centre de Biophysique Moléculaire (CBM) in Orléans.

The reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) on silica gel F₂₅₄ plates. The plates were revealed depending on the conditions required by the use of ultraviolet lamp (254 nm) or by using chemical dyes such as potassium permanganate solution (KMnO₄) to detect oxydizable compounds (alcohol for instance), ninhydrin to reveal amines, or Dragendorff's solution to detect non-reactive amines such as protected amines on macrocyclic compounds.

Flash chromatographies were performed using Interchim flash chromatography Spot II device.

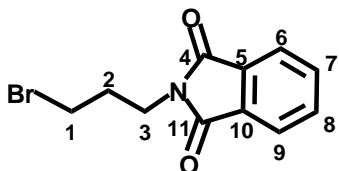
7.4.1.2. Synthesis procedures

Note: the numbering of the carbons atoms used for NMR assignment is independent of the numbering system used for nomenclature. The number of the compounds corresponds to the number given in the synthesis schemes in Chapter 4.

Partie expérimentale

2-(3-bromopropyl)isoindoline-1,3-dione

Compound 2



Chemical Formula: $C_{11}H_{10}BrNO_2$

Molecular Weight: $268.11 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

1,3-dibromopropane (7.2 eq, 10 mL, 98.1 mmol) was dissolved in dimethylformamide (20 mL) then K_2CO_3 (4eq, 7.5g, 54.36 mmol) was added under stirring. A solution of phthalimide (1 eq, 2 g, 13.59 mmol) in dimethylformamide (20 mL) was added drop-wise during 15 min. The reaction mixture was stirred during 48 h at room temperature. After filtration of solids, the filtrate was evaporated. The product was then dissolved in diethyl ether; the residual phthalimide precipitated and was removed by filtration.

The product was then dried under vacuum to a white powder with a 75% yield. $R_f=0.33$ petroleum ether/ethyl acetate (9:1)

1H NMR: ($CDCl_3$, 600 MHz), δ ppm) = 2.27(2H, tt, $^3J_{H_2-H_3}=^3J_{H_2-H_1}=6.8$, H_2); 3.42 (2H, t, $^3J=6.8$ Hz, H_1); 3.84 (2H, t, $^3J=6.8$ Hz, H_3); 7.73 (2H, m, H_{7-8}); 7.85 (2H, m, H_{6-9}).

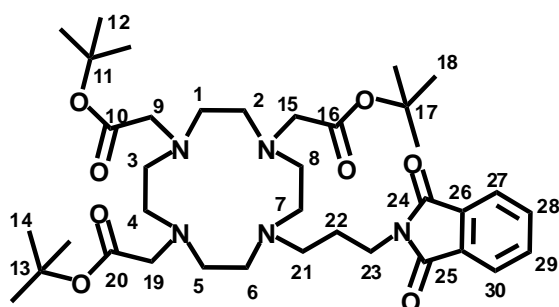
^{13}C NMR: ($CDCl_3$, 150 MHz), δ ppm) = 29.8 (C_1); 31.6 (C_2); 36.7 (C_3); 123.3 (C_{6-9}); 132.0 (C_{5-10}); 134.1 (C_{7-8}); 168.2 (C_{4-11}).

HRMS: calculated for $C_{11}H_{11}BrNO_2$: $m/z=267.996767$, measured: $m/z=267.996753$

Partie expérimentale

Tri-*tert*-butyl 2, 2', 2''-(10-(3-(1, 3-dioxoisindolin-2-yl)propyl)-1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane-1, 4, 7-triyl) triacetate

Compound 3



Chemical Formula: $C_{37}H_{59}N_5O_8$
Molecular Weight: $701.89 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

DO3AtBu (1 eq, 500 mg, 0.97 mmol) was dissolved in acetonitrile (30 mL). NaI (0.69 eq, 100 mg, 0.67 mmol), compound **2** (1.2 eq, 311 mg, 1.16 mmol) and K_2CO_3 (421 mg, 3.05 mmol) were added to the solution. The reaction mixture was stirred 3 days at 81°C . The solids were filtered off and the filtrate was evaporated under vacuum. The purification was performed using flash chromatography with silica gel column ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1) to give yellow oil. Yield: 70%

^1H NMR: ($CDCl_3$, 600 MHz), δ ppm) = 1.23-1.26 (27H, m, $H_{12,14,17}$); 1.63 (2H, tt, $^3J_{H22-H23}=^3J_{H22-H21}=7.6$, H_{22}); 2.09-2.79 (18H, m, $H_{1,2,3,4,5,6,7,8,21}$); 2.83-3.11 (6H, m, $H_{9,15,19}$); 3.48 (2H, t, $^3J=7.6$ Hz, H_{23}); 7.59-7.64 (4H, m, $H_{27, 28,29,30}$).

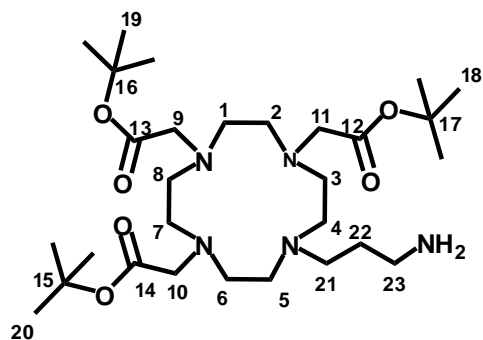
^{13}C NMR: ($CDCl_3$, 150 MHz), δ ppm) = 25.8 (C_{22}); 27.9, 28.0, 28.2 ($C_{18, 12, 14}$), 36.2 (C_{23}); 50.6 (C_{21}); 51.2, 51.9, 53.0, 53.1 ($C_{1,2,3,4,5,6,7,8}$); 55.9, 57.1 ($C_{9,15,19}$); 82.1, 82.5, 82.9 ($C_{11,13,17}$); 123.4, ($C_{27,30}$); 132.1($C_{26,31}$); 134.3 ($C_{28,29}$); 168.3 ($C_{24,25}$); 169.9, 172.9 ($C_{10,16,20}$).

HRMS: calculated for $C_{37}H_{60}N_5O_8$: $m/z= 702.443640$, measured: $m/z= 702.443338$

Partie expérimentale

Tri-*tert*-butyl 2, 2', 2''-(10-(3-aminopropyl)-1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane-1, 4, 7-triyl) triacetate

Compound 4



Chemical Formula: C₂₉H₅₇N₅O₆
Molecular Weight: 571.79 g.mol⁻¹

Compound **3** (569 mg, 0.811 mmol) was dissolved in hydrazine hydrate (30 mL). The reaction mixture was stirred at 90 °C during 30 min. Then the solvent was evaporated, the residue was dissolved in dichloromethane and washed several times with water. The organic phase was then dried over Na₂SO₄ and evaporated under vacuum to give the compound **4** as a yellowish powder with 60% yield.

¹H NMR: (CDCl₃, 600 MHz), δ ppm) = 1.40 (18H, s, H_{18, 20}); 1.41 (9H, s, H₁₆); 1.59 (2H, tt, ³J_{H22-H23}=³J_{H22-H21}=5.2 Hz, H₂₂); 2.52 (18H, m, H_{1,2,3,4,5,6,7,8,21}); 3.12 (8H, bs, H_{9,10,11,23}); 8.19 (2H, s, NH₂).

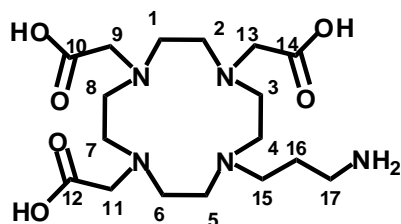
¹³C NMR: (CDCl₃, 150 MHz), δ ppm) = 23.6 (C₂₂); 27.8 (C₁₉); 27.9 (C_{18,20}); 39.2 (C₂₃); 49.6 (C₂₁); 50.0 (C_{4,5}); 50.8 (C_{1,2,3,6,7,8}); 56.6 (C_{10,11}); 57.9 (C₉); 81.8 (C_{15,17}); 88.5 (C₁₆); 170.5 (C_{14,12}); 172.7 (C₁₃).

HRMS: calculated for C₂₉H₅₈N₅O₆: m/z=572.438161, measured: m/z= 572.438156

Partie expérimentale

2, 2', 2''-(10-(3-aminopropyl)-1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane-1, 4, 7-triyl) triacetic acid

Compound L₁



Chemical Formula: C₁₇H₃₃N₅O₆
Molecular Weight: 403.47 g.mol⁻¹

To a solution of compound **4** (1eq, 154 mg, 0.270 mmol) in dichloromethane (6 mL) was added TFA (300 eq, 6.22 mL, 81 mmol). The reaction mixture was stirred 18 h at room temperature. The product was then evaporated under vacuum. The resulting oil was dissolved in small amount of dichloromethane and cold diethyl ether was added. The precipitate was filtered and dried under vacuum to give the product **L₁** as a white powder with 55% yield.

¹H NMR: (D₂O, 600 MHz), δ ppm) = 1.80 (2H, bs, H₁₆); 2.3 (2H, bs, H₁₆); 2.92-3.24 (16H, m, H_{1,2,3,4,5,6,7,8}); 3.32-3.77 (8H, m, H_{9,11,13,17}).

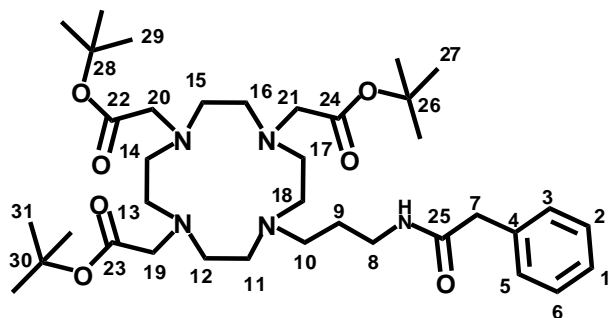
¹³C NMR: (D₂O, 150 MHz), δ ppm) = 23.6 (C₂₂); 27.8 (C₁₉); 27.9 (C_{18,20}); 39.2 (C₂₃); 49.6(C₂₁); 50.0 (C_{4,5}); 50.8 (C_{1,2,3,6,7,8}); 56.6 (C_{10,11}); 57.9 (C₉); 81.8 (C_{15,17}); 88.5 (C₁₆); 170.5 (C_{14,12}); 172.7 (C₁₃).

HRMS: calculated for C₁₇H₃₄N₅O₆: m/z=404.250360, measured: m/z= 404.250450

Partie expérimentale

Tri-*tert*-butyl 2, 2', 2''-(10-(3-(2-phenylacetamido)propyl)-1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane-1, 4, 7-triyl) triacetate

Compound 5



Chemical Formula: $C_{37}H_{63}N_5O_7$
Molecular Weight: $689.93 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a solution of compound 4 (1eq, 527 mg, 0.92 mmol) in tetrahydrofuran (10 mL), was added 1.3eq of phenylacetylchloride (0.262 mL, 1.98 mmol) and 3 eq of triethylamine (0.350 μL , 2.8 mmol). The reaction mixture was stirred 1h at 0 °C and 2 h at room temperature. After reaction, the remaining phenylacetylchloride was hydrolyzed using a basic solution of K_2CO_3 , the solvent tetrahydrofuran was then evaporated under vacuum and the product was extracted several times with dichloromethane. The organic phase was dried over Na_2SO_4 . Solid was filtered and solvent was evaporated under vacuum to give compound 5 as a yellow oil with 97% yield. TLC: dichloromethane/ methanol (9:1) $R_f = 0.71$

The product has been used in the next step without further purification.

$^1\text{H NMR}$: ($CDCl_3$, 600 MHz), δ ppm) = 1.44 (9H, s, H_{29}); 1.45 (18H, s, $H_{27,31}$); 1.59 (2H, tt, $^3J_{H9-H8} = ^3J_{H9-H10} = 6.60\text{Hz}$, H_9), 2.51 (2H, bs, H_{10}); 2.58-2.73 (18H, m, $H_{10,11,12,13,14,15,16,17,18}$); 3.15-3.29 (8H, m, $H_{8,19,20,21}$); 3.53 (2H, s, H_7); 7.12-7.34 (5H, m, $H_{1,2,3,5,6}$).

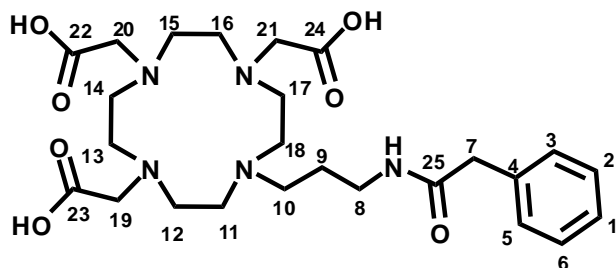
$^{13}\text{C NMR}$: ($CDCl_3$, 150 MHz), δ ppm) = 25.6 (C_9); 27.9 (C_{29}); 28.2 ($C_{27,31}$); 43.2 (C_8); 43.3(C_7); 49.0($C_{12,17}$); 51.6 (C_{10}); 52.2 ($C_{16,13}$); 52.6 ($C_{11,18}$); 53.6 ($C_{27,31}$); 56.2 (C_{20}); 56.6 ($C_{19,21}$); 80.9 ($C_{26,28,30}$); 127.0 (C_1); 128.6 ($C_{2,6}$); 129.5 ($C_{3,5}$); 134.0 (C_4); 170.6($C_{23,24}$); 170.8 (C_{22}).

HRMS: calculated for $C_{37}H_{64}N_5O_7$: $m/z = 690.480026$, measured: $m/z = 690.480305$

Partie expérimentale

2, 2', 2''-(10-(3-(2-phenylacetamido)propyl)-1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane-1, 4, 7-triyl) triacetic acid

Compound L₂



Chemical Formula: C₂₅H₃₉N₅O₇
Molecular Weight: 521.61 g.mol⁻¹

To a solution of compound **5** (1eq, 737 mg, 1.07 mmol) in dichloromethane (20 mL) was added TFA (300 eq, 24 mL, 320 mmol). The reaction mixture was stirred 18 h at room temperature. The product was then evaporated under vacuum. The resulting oil was dissolved in small amount of dichloromethane and cold diethyl ether was added. The precipitate was filtered, dried under vacuum and solubilized in a small amount of water to allow reversed-phase Flash chromatography purification to give a yellowish powder with a quantitative yield.

¹H NMR: (D₂O, 600 MHz), δ ppm) = 1.86 (2H, tt, ³J_{H9-H8}=³J_{H9-H10}=6.7Hz, H₉); 2.74-3.00 (8H, m, H_{12,13,16,17}); 2.93 (2H, m, H₁₀); 3.19 (2H, m, H₈); 3.22 (4H, m, H_{11,18}); 3.38 (4H, m, H_{14,15}); 3.39 (4H, m, H_{19,21}); 3.47 (2H, s, H₇); 3.99 (2H, s, H₂₀); 7.22-7.32 (5H, m, H_{1,2,3,5,6}).

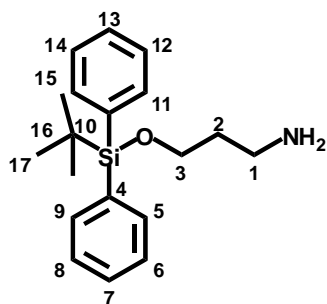
¹³C NMR: (D₂O, 150 MHz), δ ppm) = 23.1 (C₉); 36.3 (C₈); 42.6 (C₇); 48.1 (C_{12,17}); 48.3 (C_{13,16}); 49.9 (C_{11,18}); 52.1 (C₁₀); 52.9 (C_{19,21}); 127.4 (C₁); 128.9 (C_{2,6}); 135.1 (C₄); 174.1 (C₂₅); 175.0 (C_{22,23,24}).

HRMS: calculated for C₂₅H₄₀N₅O₇: m/z= 522.292225, measured: m/z= 522.2925

Partie expérimentale

3-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)propan-1-amine

Compound 9



Chemical Formula: C₁₉H₂₇NOSi
Molecular Weight : 313.51 g.mol⁻¹

Compound **9** was synthesized according to reference [3].

3-aminopropanol (2.5 eq, 3.80 mL, 50.0 mmol) was dissolved in dichloromethane (50 mL) and cooled at 0° C. A solution of *ter*-butylchlorodiphenylsilane (1 eq, 5.20 mL, 20.0 mmol) in dichloromethane (10 mL) was added drop-wise in 15 min to the cooled solution. The reaction mixture was stirred at room temperature during 2 days. The reaction mixture was then extracted with 10% (w/v) aq. NaHSO₄ (2x 50 mL) and saturated aq. NaHCO₃ (2x 50 mL). Purification was performed over a silica gel chromatography column to give a yellow oil with 48% yield. TLC: dichloromethane/ methanol (7:3) R_f = 0.45

¹H NMR: (CDCl₃, 600 MHz), δ ppm) = 1.05 (9H, s, H₁₇); 1.37 (2H, bs, NH₂); 1.69(2H, tt, ³J_{H2-H1}=³J_{H2-H3}=6.3Hz, H₂); 2.83 (2H, t, ³J=6.3Hz, H₁); 3.74 (2H, t, ³J=6.3Hz, H₃); 7.39 (6H,m,H_{5,7,9,11,13,15}) 7.67 (4H, m, H_{6,8,9,12,14}).

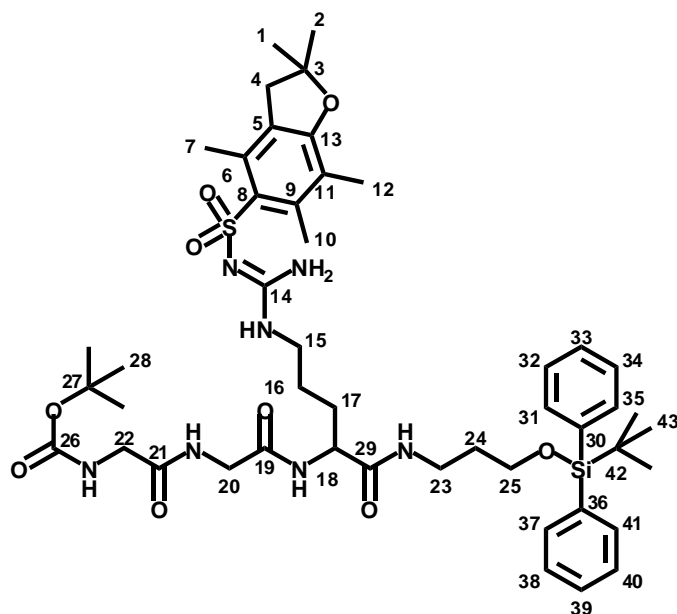
¹³C NMR: (CDCl₃, 150 MHz), δ ppm) = 19.2 (C₁₆); 26.89 (C₁₇); 36.2 (C₂); 39.3 (C₁); 61.9 (C₃); 127.7 (C_{6,8,12,14}); 129.6 (C_{7,13}); 133.9 (C_{4,10}); 135.6 (C_{5,9,11,15}).

HRMS: calculated for C₁₉H₂₉NOSi: m/z= 314.193467, measured: m/z= 314.193583

Partie expérimentale

(E)-tert-butyl (2,2-dimethyl-9, 12, 15-trioxo-10-(3-(2-((2,2,4,6,7-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)sulfonyl)guanidino)propyl)-3, 3-diphenyl-4-oxa-8,11 ,14-triaza-3-silahexadecan-16-yl)carbamate

Compound 10



Chemical Formula: $C_{47}H_{69}N_7O_9SSi$
Molecular Weight : $936.24 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Compound **10** was synthesized according to the procedure described in reference [4]. The procedure was adapted as following:

PyBop coupling of Fmoc-Arg(Pbf)-OH to the linker **9** 3-((tert-butyl)diphenylsilyl)oxy)propan-1-amine: 3-((tert-butyl)diphenylsilyl)oxy)propan-1-amine (1 eq, 500 mg, 1.59 mmol) and Fmoc-Arg(Pbf)-OH (2 eq, 2.07 g, 3.19 mmol) were dissolved in dichloromethane (17 mL) under stirring.

PyBop was weighted out (2 eq, 1.7 g, 1.59 mmol) but not added to the solution mixture. DIEA, (2.72 eq, 0.740 mL, 4.34 mmol) were added to the reaction vessel slowly via syringe. The PyBop was then added immediately to the reaction mixture and the solution was allowed to stir 6 h at room temperature. The coupling was verified by TLC .dichloromethane/methanol (9:1). $R_f=0.67$

Deprotection of Fmoc-Arg(Pbf)-linker **9**

After verification of coupling, TAEA (20 eq, 4 mL, 63.8 mmol) was added via syringe to the reaction mixture to deprotect the N-terminal amino acid. The reaction was allowed to stir overnight at room temperature. The deprotection was monitored by TLC to verify conversion it was done in dichloromethane/methanol (9:1). $R_f=0.20$

After verifying the deprotection has come to completion, 20mL of ethyl acetate were added. The solution was transferred to separatory funnel and washed with 40mL of Brine. After phase separation the solution was extracted three times with 40mL of phosphate buffer. The organic phase was dried over Na_2SO_4 and evaporated under vacuum to give a yellow residue.

PyBop coupling of Fmoc-Gly-OH to NH_2 -Arg(Pbf)-linker **9**

The product carried over the previous steps was redissolved in dichloromethane (17 mL) with Fmoc-Gly-OH (2 eq, 948 mg, 3.19 mmol) added under stirring.

Partie expérimentale

PyBop was weighted out (2 eq, 1.7 g, 1.59 mmol) but not added to the solution mixture. DIEA, (2.72 eq, 0.740 mL, 4.34 mmol) were added to the reaction vessel slowly via syringe. The PyBop was then added immediately to the reaction mixture and the solution was allowed to stir 6h at room temperature. The total conversion of the free amine was verified by TLC performed in dichloromethane/methanol (9:1). $R_f=0.96$

Deprotection of Fmoc-Gly-Arg(Pbf)-linker 9

After verification of coupling, TAEA (20 eq, 4 mL, 63.8 mmol) was added via syringe to the reaction mixture to deprotect the N-terminal amino acid. The reaction was allowed to stir overnight at room temperature.

The deprotection was monitored by TLC in dichloromethane/methanol (9:1). $R_f=0.34$

After verifying the deprotection has come to completion, 20 mL of ethyl acetate were added. The solution was transferred to separatory funnel and washed with 40 mL of Brine. After phase separation the solution was extracted three times with 40 mL of phosphate buffer. The organic phase was dried over Na_2SO_4 and evaporated under vacuum to give a yellow residue.

PyBop coupling of Boc-Gly-OH to NH_2 -Gly-Arg(Pbf)-linker 9

The product carried over the previous steps was redissolved in dichloromethane (17mL) with Boc-Gly-OH (2 eq, 558 mg, 3.19 mmol) added under stirring.

PyBop was weighted out (2 eq, 1.7 g, 1.59 mmol) but not added to the solution mixture. DIEA, (2.72 eq, 0.740 mL, 4.34 mmol) were added to the reaction vessel slowly via syringe. The PyBop was then added immediately to the reaction mixture and the solution was allowed to stir 6h at room temperature. The coupling was verified by TLC performed in dichloromethane/methanol (9:1). $R_f = 0.85$

Purification was performed over silica gel Flash chromatography to give a white to yellow powder with a global yield of 60%.

^1H NMR: (CDCl_3 , 600 MHz), δ ppm) = 1.02 (9H, s, H_{43}); 1.37 (9H, s, H_{28}); 1.44 (6H, s, H_{1-2}); 1.77 (6H, m, $\text{H}_{16-17-24}$); 2.06 (3H, s, H_{12}); 2.48 (3H, s, H_7); 2.55 (3H, s, H_{10}); 2.92 (2H, s, H_4); 3.16 (2H, td, $^3J=6.6\text{Hz}$, $^3J=3.7\text{Hz}$, H_{15}); 3.32 (2H, m, H_{23}); 3.67 (2H, t, $^3J=5.8\text{Hz}$, H_{25}); 3.79 (2H, m, H_{20}); 3.95 (2H, m, H_{22}); 4.41 (1H, td, $^3J=8.6\text{Hz}$, $^3J=3.5\text{Hz}$, H_{18}); 5.76 (1H, bs, C_{20}NH); 6.25 (1H, bs, C_{15}NH); 6.38 (2H, bs, C_{14}NH_2); 7.20 (1H, bs, C_{23}NH); 7.36 (6H, m, $\text{H}_{31,33,35,37,39,41}$); 7.54 (1H, bs, C_{18}NH); 7.63 (4H, bd, $J=7.68\text{Hz}$, $\text{C}_{32,34,38,40}\text{H}$); 7.75 (1H, bs, C_{22}NH).

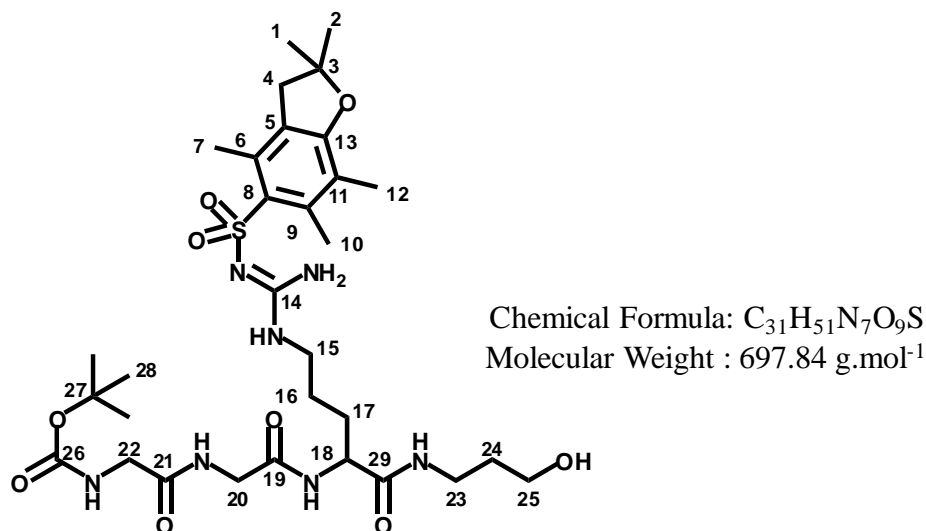
^{13}C NMR: (CDCl_3 , 150 MHz), δ ppm) = 12.5 (C_{12}); 18.0 (C_{10}); 19.2 (C_{41}); 19.3 (C_7); 26.4 (C_{16}); 26.9 (C_{42}); 28.3 (C_{28}); 28.6 ($\text{C}_{1,2}$); 29.44 (C_{17}); 32.0 (C_{24}); 37.1 (C_{23}); 40.2 (C_{15}); 42.9 (C_{22}); 43.1 (C_4); 44.2 (C_{20}); 53.2 (C_{18}); 61.8 (C_{25}); 80.2 (C_{27}); 86.4 (C_3); 117.5 (C_{11}); 124.6 (C_5); 127.7 ($\text{C}_{31,33,37,39}$); 129.8 ($\text{C}_{32,38}$); 132.2 (C_6); 132.8 (C_9); 133.7 ($\text{C}_{29,35}$); 135.5 ($\text{C}_{30,34,36,40}$); 138.3 (C_8); 156.6 (C_{19}); 158.7 (C_{13}); 169.5(C_{21}); 171.4 (C_{26}); 171.9(C_{29}).

HRMS: calculated for $\text{C}_{47}\text{H}_{70}\text{N}_7\text{O}_9\text{SSi}$: $m/z=936.471951$, measured: $m/z=936.471602$

Partie expérimentale

(E)-tert-butyl (2-((2-((1-((hydroxypropyl)amino)-1-oxo-5-(2-((2,2,4,6,7-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)sulfonyl)guanidino)pentan-2-yl)amino)-2-oxoethyl)amino)-2-oxoethyl)carbamate

Compound 11



To a solution of compound **10** (1 eq, 557 mg, 0.595 mmol) dissolved in THF (27 mL) were added 0.689 mL (4eq, 2.38mmol) of TBAF. The reaction mixture was allowed to stir overnight at room temperature. The deprotection of the alcohol was verified by TLC performed in dichloromethane/methanol (9:1). R_f =0.30

Purification was performed over silica gel Flash chromatography to give a white to yellow powder with a quantitative yield.

¹H NMR: (CDCl₃, 600 MHz), δ ppm) = 1.32 (9H, s, H₂₈); 1.38 (6H, s, H_{1,2}); 1.49(2H, m, H₁₆); 1.58 (2H, m, H₂₄); 1.75 (2H, m, H₁₇); 2.00 (3H, s, H₁₂); 2.41 (3H, s, H₇); 2.49 (3H, s, H₁₀); 2.87 (2H, s, H₄); 3.11 (2H, m, H₁₅); 3.25 (2H, m, H₂₃); 3.52 (2H, t, ³J=5.5Hz, H₂₅); 3.74 (2H, m, H₂₂); 3.89 (2H, m, H₂₀); 4.33 (1H, t, ³J=7.0Hz, H₁₈); 5.94 (1H, s, C₂₂NH); 6.35 (2H, s, C₁₄NH₂); 6.40 (1H, s, C₁₅NH); 7.57 (1H, s, C₂₃NH); 7.67 (1H, s, C₁₈NH), 7.85 (1H, s, C₂₀NH).

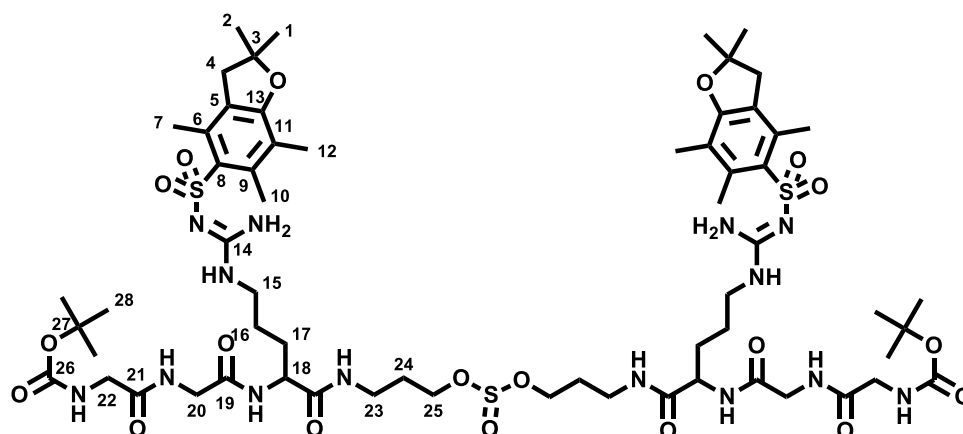
¹³C NMR: (CDCl₃, 150 MHz), δ ppm) =12.5 (C₁₂); 18.0 (C₁₀); 19.3 (C₇); 25.7 (C₁₆); 28.3 (C_{28x3}); 28.6 (C₁₋₂); 29.0 (C₁₇); 31.6 (C₂₄); 36.6 (C₂₃); 40.3 (C₁₅); 43.1 (C₂₀); 43.2 (C₄); 44.3 (C₂₂); 53.5 (C₁₈); 59.4 (C₂₅); 80.1 (C₂₇); 86.4 (C₃); 117.6 (C₁₁); 124.7 (C₅); 132.1 (C₆); 132.8 (C₉); 138.2 (C₈); 156.6 (C₂₆); 158.7 (C₁₃); 170.0 (C₁₉); 171.8 (C₂₁); 172.6 (C₂₉).

HRMS: calculated for C₃₁H₅₂N₇O₉S: m/z= 698.354174, measured: m/z= 698.353908

Partie expérimentale

bis(2,2-dimethyl-4,7,10,13-tetraoxo-12-(3-((E)-2-((2,2,4,6,7-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)sulfonyl)guanidino)propyl)-3-oxa-5,8,11,14-tetraazaheptadecan-17-yl) sulfite

Compound 11'



Chemical Formula: C₆₂H₁₀₀N₁₄O₁₉S₃
Molecular Weight: 1441.73 g.mol⁻¹

To a solution of compound **10** (1 eq, 115 mg, 0.165 mmol) dissolved in dichloromethane (10 mL) containing 5eq of pyridine (5eq, 0.825 mmol) were added 24 μ L (2eq, 0.33 mmol) of Thionyl chloride drop wise at 0°C. The reaction mixture was allowed to stir 30 min at 0°C and then overnight at room temperature.

Purification was performed over silica gel Flash chromatography.

¹H NMR: (CDCl₃, 600 MHz), δ ppm) = 1.32 (9H, s, H₂₈); 1.38 (6H, s, H_{1,2}); 1.49(2H, m, H₁₆); 1.58 (2H, m, H₂₄); 1.75 (2H, m, H₁₇); 2.00 (3H, s, H₁₂); 2.27 (2H, bs, H₂₅); 2.41 (3H, s, H₇); 2.49 (3H, s, H₁₀); 2.87 (2H, s, H₄); 3.11 (2H, m, H₁₅); 3.25 (2H, m, H₂₃); 3.74 (2H, m, H₂₂); 3.89 (2H, m, H₂₀); 4.33 (1H, t, ³J=7.0Hz, H₁₈); 5.94 (1H, s, C₂₂NH); 6.35 (2H, s, C₁₄NH₂); 6.40 (1H, s, C₁₅NH); 7.57 (1H, s, C₂₃NH); 7.67 (1H, s, C₁₈NH), 7.85 (1H, s, C₂₀NH).

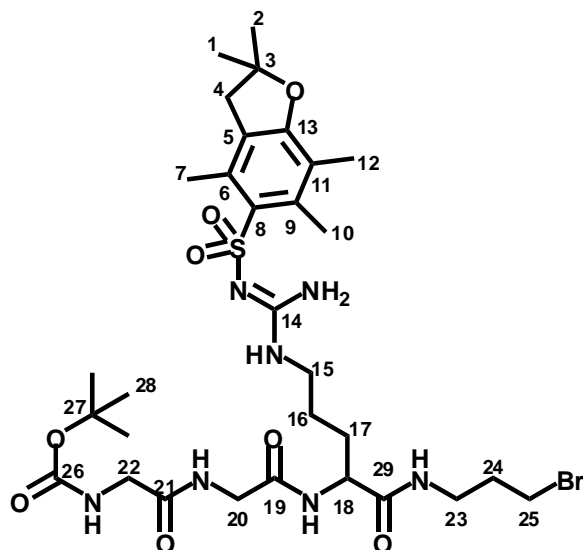
¹³C NMR: (CDCl₃, 150 MHz), δ ppm) =12.5 (C₁₂); 18.0 (C₁₀); 19.3 (C₇); 25.7 (C₁₆); 28.3 (C_{28x3}); 28.6 (C₁₋₂); 29.0 (C₁₇); 31.6 (C₂₄); 36.0 (C₂₅); 36.6 (C₂₃); 40.3 (C₁₅); 43.1 (C₂₀); 43.2 (C₄); 44.3 (C₂₂); 53.5 (C₁₈); 80.1 (C₂₇); 86.4 (C₃); 117.6 (C₁₁); 124.7 (C₅); 132.1 (C₆); 132.8 (C₉); 138.2 (C₈); 156.6 (C₂₆); 158.7 (C₁₃); 170.0 (C₁₉); 171.8 (C₂₁); 172.6 (C₂₉).

HRMS: calculated for C₇₀H₈₉N₁₂O₁₇S₂: m/z= 1441.652286, measured: m/z= 1441.64513

Partie expérimentale

(E)-tert-butyl (2-((2-((1-((3-bromopropyl)amino)-1-oxo-5-(2-((2,2,4,6,7-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)sulfonyl)guanidino)pentan-2-yl)amino)-2-oxoethyl)amino)-2-oxoethyl)carbamate

Compound 12



Chemical Formula: C₃₁H₅₀BrN₇O₈S

Molecular Weight: 760.74 g.mol⁻¹

To a solution of compound **11** (1 eq, 70 mg, 0.1 mmol) dissolved in THF (8mL) were added 108 mg (4.1 eq, 0.4 mmol) of triphenylphosphine under stirring at -15 °C. After total dissolution of triphenylphosphine, a solution of 69mg (3.9 eq, 3.9 mmol) of N-bromosuccinimide in THF is added drop wise in the reaction mixture. The reaction mixture was allowed to stir 3 days at room temperature. The disappearing of the alcohol moiety was verified by TLC performed in dichloromethane/methanol (9:1). R_f=0.65. Purification was performed over silica gel Flash chromatography to give a white powder with a yield of 40%.

¹H NMR: (CDCl₃, 600 MHz), δ ppm) = 1.33 (9H, s, H₂₈); 1.39 (6H, s, H₁₋₂); 1.51(2H, m, H₁₆); 1.75 (2H, m, H₁₇); 1.98 (2H, m, H₂₄); 2.01 (3H, s, H₁₂); 2.42 (3H, s, H₇); 2.49 (3H, s, H₁₀); 2.88 (2H, s, H₄); 3.16 (2H, m, H₁₅); 3.27 (2H, m, H₂₃); 3.33 (2H, t, ³J=6.7Hz, H₂₅), 3.74 (2H, m, H₂₂); 3.90 (2H, m, H₂₀); 4.39 (1H, t, ³J=7.0 Hz, H₁₈); 5.72 (1H, s, C₂₂NH); 6.34 (3H, bs, C₁₄NH₂ and C₁₅NH); 7.45 (1H, s, C₂₃NH); 7.56 (1H, s, C₁₈NH), 7.74 (1H, s, C₂₀NH).

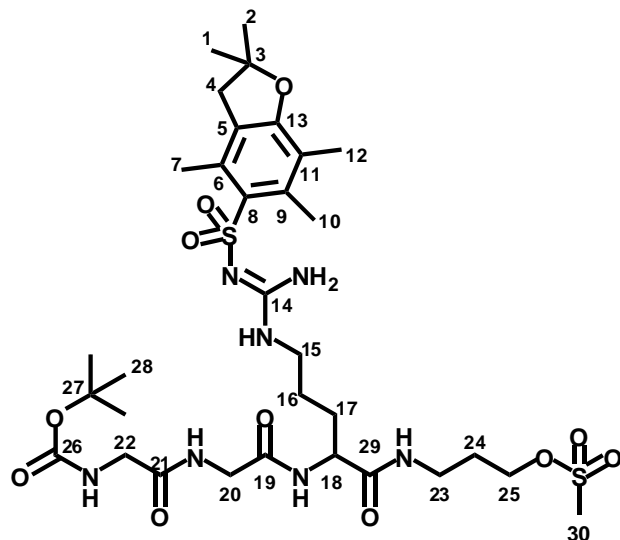
¹³C NMR: (CDCl₃, 150 MHz), δ ppm) =12.5 (C₁₂); 18.0 (C₁₀); 19.3 (C₇); 25.7 (C₁₆); 28.3 (C_{28x3}); 28.6 (C₁₋₂); 29.0 (C₁₇); 30.9 (C₂₅); 32.6 (C₂₄); 38.1 (C₂₃); 40.3 (C₁₅); 43.1 (C₂₀); 43.2 (C₄); 44.3 (C₂₂); 53.5 (C₁₈); 80.1 (C₂₇); 86.4 (C₃); 117.6 (C₁₁); 124.7 (C₅); 132.1 (C₆); 132.8 (C₉); 138.2 (C₈); 156.6 (C₂₆); 156.7 (C₁₄); 158.7 (C₁₃); 170.0 (C₁₉); 171.8 (C₂₁); 172.6 (C₂₉).

HRMS: calculated for C₃₁H₅₁BrN₇O₈S: m/z= 760.269771, measured: m/z= 760.270077

Partie expérimentale

(E)-2, 2-dimethyl-4, 7, 10, tetraoxo-12-(3-(2-((2, 2, 4, 6, 7-pentamethyl-2, 3-dihydrobenzofuran-5-yl)sulfonyl)guanidino)propyl)-3-oxa-5, 8, 11, 14-tetraazaheptadecan-17-yl methanesulfonate

Compound 13



Chemical Formula: C₃₂H₅₃N₇O₁₁S₂

Molecular Weight: 775.93 g.mol⁻¹

To a solution of compound **11** (1 eq, 803 mg, 1.15 mmol) in 15 mL of dichloromethane were added 1.4 eq of NEt₃ (218 μL, 1.61 mmol) under stirring. The mixture was then cooled to 0°C and methane sulfonyl chloride (1.4 eq, 124 μL, 1.64 mmol) was added drop wise. The reaction was allowed to stir 30min at 0 °C and one night at room temperature. The disappearance of the alcohol function was verified by TLC performed in dichloromethane/methanol (9:1). The TLC was stained with KMnO₄ to verify the absence of the free alcohol.

Purification was performed over silica gel Flash chromatography to give yellow oil with a yield of 65%.

¹H NMR: (CDCl₃, 600 MHz), δ ppm = 1.41 (9H, s, H₂₈); 1.46 (6H, s, H₁₋₂); 1.56 (2H, m, H₁₆); 1.73 (2H, m, H₁₇); 1.95 (2H, m, H₂₄); 2.08 (3H, s, H₁₂); 2.52 (3H, s, H₇); 2.60 (3H, s, H₁₀); 2.94 (2H, s, H₄); 3.07 (3H, s, H₃₀); 3.13 (2H, m, H₁₅); 3.27 (2H, m, H₂₃); 3.82 (2H, m, H₂₂); 3.92 (2H, m, H₂₀); 4.27 (2H, t, ³J=6.1Hz, H₂₅); 4.47 (1H, t, ³J=7.0 Hz, H₁₈); 5.75 (1H, s, C₂₂NH); 6.32 (3H, bs, C₁₄NH₂ and C₁₅NH); 7.40 (1H, s, C₂₃NH); 7.55 (1H, s, C₁₈NH), 7.66 (1H, s, C₂₀NH).

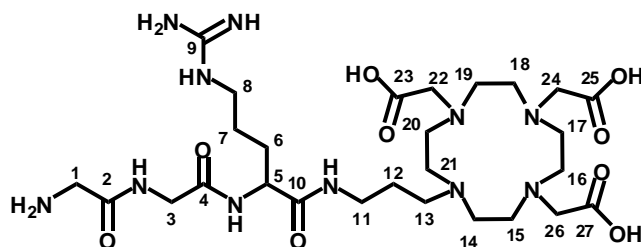
¹³C NMR: (CDCl₃, 150 MHz), δ ppm = 12.4 (C₁₂); 17.9 (C₁₀); 19.2 (C₇); 25.7 (C₁₆); 28.3 (C_{28x3}); 28.5 (C₁₋₂); 28.6 (C₁₇); 32.0 (C₂₄); 35.3 (C₂₃); 36.9 (C₃₀); 40.3 (C₁₅); 43.1 (C₂₀); 43.2 (C₄); 44.3 (C₂₂); 53.3 (C₁₈); 68.0 (C₂₅); 79.6 (C₂₇); 86.1 (C₃); 117.2 (C₁₁); 124.3 (C₅); 132.1 (C₆); 133.3 (C₉); 138.1 (C₈); 156.5 (C₂₆); 156.7 (C₁₄); 158.4 (C₁₃); 170.0 (C₁₉); 171.5 (C₂₁); 172.3 (C₂₉).

HRMS: calculated for C₃₂H₅₄N₇O₁₁S₂: m/z= 776.331724, measured: m/z= 776.332102

Partie expérimentale

2,2',2''-(10-(3-(2-(2-(2-aminoacetamido)acetamido)-5-guanidinopentanamido)propyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid

Compound L₃



Chemical Formula: C₂₇H₅₁N₁₁O₉
Molecular Weight: 673.76 g.mol⁻¹

Peptide elongation was performed on an aminomethylated polystyrene resin (0.056 mmol, 1.4 mmol/g) by using standard Fmoc/*tert*-butyl chemistry with HATU/DIEA activation in DMF. Coupling reactions were repeated until total peptidic coupling, monitored through Kaiser Test. At the end of each amino acid coupling reaction, the Fmoc protecting group of the last amino acid was removed with 20% piperidine in DMF. The Fmoc deprotection reactions were monitored measuring UV absorbance (301 nm) of the forming dibenzofluvene-piperidine adduct. Final deprotection and cleavage from the solid support were performed with TFA/H₂O/TIS: 90/5/5 by vol for 2 h (10 mL). The crude peptide was precipitated in cold Et₂O/petroleum ether: 1/1 by vol (100 mL), centrifugated, solubilized in deionized water, and lyophilized. Purification was performed by reversed-phase Flash chromatography using a linear water-acetonitrile gradient. White powder was obtained with 80% yield.

¹H NMR: (D₂O, 600 MHz), δ ppm = 1.50 (2H, m, H₇); 1.66 (2H, m, H₆); 1.86 (2H, m, H₁₂); 2.94 (4H, m, H_{15, 20}); 3.01 (4H, m, H_{16, 19}); 3.07 (2H, t, ³J=6.9Hz, H₈); 3.17 (4H, m, H_{11, 13}); 3.29 (4H, m, H_{14, 21}); 3.41 (4H, m, H_{17, 18}); 3.43 (4H, m, H_{22, 26}); 3.77 (2H, s, H₁); 3.90 (2H, s, H₃); 4.09 (2H, s, H₂₄); 4.10 (1H, m, H₅).

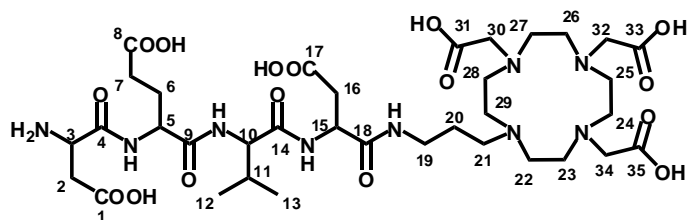
¹³C NMR: (D₂O, 150 MHz), δ ppm = 22.9 (C₁₂); 24.4 (C₇); 28.0 (C₆); 36.4 (C₁₁); 40.4 (C₁); 40.4 (C₈); 42.3 (C₃); 48.0 (C_{15, 20}); 48.4 (C_{19, 16}); 49.9 (C_{14, 21}); 51.8 (C_{17, 18}); 52.0 (C₁₃); 52.9 (C_{22, 26}); 53.8 (C₅); 54.1 (C₂₄); 156.7 (C₉); 167.7 (C₂); 168.5 (C₂₅); 171.2 (C₄); 173.8 (C₁₀); 174.3 (C_{23, 27}).

HRMS: calculated for C₂₇H₅₂N₁₁O₉: m/z= 674.394399, measured: m/z= 674.394803

Partie expérimentale

2,2',2''-(10-(15-amino-16-carboxy-12-(2-carboxyethyl)-6-(carboxymethyl)-9-isopropyl-5,8,11,14-tetraoxo-4,7,10,13-tetraazahexadecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid

Compound L₄



Chemical Formula: C₃₅H₅₉N₉O₁₆
Molecular Weight: 861.89 g.mol⁻¹

The same synthesis proceeding as for compound L₃ was used. White powder was obtained with 76% yield.

¹H NMR: (D₂O, 600 MHz), δ ppm) = 0.82 (3H, d, ³J=6.8Hz, H₁₂); 0.83 (3H, d, ³J=6.8Hz, H₁₃); 1.89 (2H, m, H₂₀); 1.95 (2H, m, H₆); 1.96 (1H, m, H₁₁); 2.37 (2H, m, H₇); 2.77 (2H, m, H₂); 2.97 (2H, m, H₁₆); 2.98 (2H, m, H₁₉); 3.00 (4H, m, H_{23,28}); 3.06 (4H, m, H_{24,27}); 3.16 (2H, m, H₂₁); 3.32 (4H, m, H_{22,29}); 3.44 (4H, s, H_{30,34}); 3.46 (4H, m, H_{25,26}); 3.94 (1H, d, ³J= 7.5Hz, H₁₀); 4.13 (2H, s, H₃₂); 4.28 (1H, t, ³J= 6.1Hz, H₁₅); 4.36 (1H, t, ³J= 7.13z, H₅); 4.52 (1H, t, ³J= 6.83Hz, H₃).

¹³C NMR: (D₂O, 150 MHz), δ ppm) = 17.8 (C₁₂); 18.3 (C₁₃); 22.9 (C₂₀); 26.1 (C₆); 29.8 (C₇); 29.9 (C₁₁); 34.6 (C₁₉); 35.3 (C₂); 36.5 (C₁₆); 48.0 (C_{23,28}); 48.5 (C_{24,27}); 49.4 (C₁₅); 50.0 (C_{22,29}); 50.3 (C₃); 51.9 (C_{34,30}); 52.1 (C₂₁); 52.9 (C_{25,26}); 53.2 (C₅); 54.6 (C₃₂); 59.8 (C₁₀); 168.4 (C₃₃); 168.5 (C₁₈); 172.1 (C₉); 172.4 (C₄); 172.9 (C₁₄); 173.0 (C₁₇); 173.8 (C₁); 174.3 (C_{31,35}); 176.8 (C₈).

HRMS: calculated for C₃₅H₆₀N₉O₁₆: m/z= 862.415253, measured: m/z= 862.415620

Partie expérimentale

7.4.1.3. General procedure for complex preparation

Solutions of Ln^{3+} were prepared in MILIQ distilled water and their concentrations were determined by complexometric titration with a standardized EDTA solution (H_4EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid) using xylenol orange as indicator. The purity of the ligands was assessed by adding an excess of Zn^{2+} (9 equiv.) followed by complexometric titration of the non-complexed Zn^{2+} in solution with EDTA. The different complexes were prepared by mixing equimolar quantities of cation and ligand solutions stirred for 1h at room temperature. During complexation, the pH was monitored and maintained between pH= 4-5. After 1h reaction, a xylenol orange test was performed to ensure total complexation of the metal. The lanthanide concentration of the prepared complexes was controlled either by ICP (Inductively Coupled Plasma) or BMS (Bulk Magnetic Susceptibility) techniques.

7.4.2. ^1H NMRD Measurements

Proton NMRD measurements were performed on a Stelar SMARTracer Fast Field Cycling relaxometer (0.01-10 MHz) and a Bruker WP80 NMR electromagnet adapted to variable field measurements (20-80 MHz) and controlled by a SMARTracer PC-NMR console. The temperature was monitored by a VTC91 temperature control unit and maintained by a gas flow. The temperature was determined by previous calibration with a Pt resistance temperature probe. $1/T_1$ longitudinal relaxation rates were determined for **GdL₁**, **GdL₂**, **GdL₃** and **GdL₄** at the following conditions: [**GdL₁**] =6.39 mM, pH 7.00, [**GdL₂**] =1.23 mM, pH 7.17, [**GdL₃**] =0.96 mM, pH 7.36, [**GdL₄**] =0.93 mM, pH 6.98 and different temperatures (298 K, 310 K, and 323 K).

7.4.3. Luminescence lifetime measurements

The luminescence lifetime measurements of the europium complexes were performed on an Agilent Cary Eclipse Fluorescence spectrophotometer by recording the decay of the emission intensity at 616 nm, following the direct excitation of the lanthanide ion at 396 nm. Measurements were performed in both H_2O and D_2O solutions at pH/pD of 7.4 at a concentration of 1 mM. The settings were as follow: gate time: 0.05 ms; delay time: 0.1 ms; Total decay time: 10 ms; 100 cycles.

Partie expérimentale

At least three decay curves were collected for each sample; all lifetimes were analyzed as monoexponential decays. The reported lifetimes are an average of at least three successful measurements.

7.4.4. NMR measurements

^1H NMR spectra and ParaCEST measurements were recorded at 400MHz on a Bruker Advance Spectrometer using a 5 mm BBFO probe in water/ D_2O (95/5). CEST spectra were recorded using a pre-saturation pulse of 3s at 25 μT (10 mW). The spectra were obtained by recording the bulk water signal intensity as a function of the saturation frequency in a window scale of 300 ppm saturating each 1 ppm. Sample concentrations were $[\text{EuL}_1]=82$ mM, $[\text{EuL}_2]=54$ mM, $[\text{EuL}_3]=18$ mM, $[\text{EuL}_4]=18$ mM, $[\text{NdL}_1]=90$ mM, $[\text{NdL}_2]=83$ mM, $[\text{NdL}_3]=18$ mM, $[\text{NdL}_4]=17$ mM, $[\text{YbL}_1]=90$ mM, $[\text{YbL}_2]=82$ mM, $[\text{YbL}_3]=16$ mM, $[\text{YbL}_4]=19$ mM. The pH values were adjusted by adding small amounts of diluted KOH or HCl vapor.

7.4.5. Relaxometric enzymatic assays

Caspase-3 from *E. Coli* was purchased from Sigma (ref. C1224). The lyophilized powder contains 6.69 units/mg of protein.

Relaxometric enzymatic assays were monitored for **GdL₄** in 50mM HEPES buffer containing NaCl 100mM and DTT 10 mM at pH = 7.4. The concentration of the complex in the tube was 0.94 mM. 6.69×10^{-3} U of Caspase-3 enzyme were added to the complex solution.

Urokinase, high molecular weight from human urine was purchased from Calbiochem (ref. 672081). Relaxometric enzymatic assays were monitored for **GdL₃** in 50mM phosphate buffer containing 7 mg/mL of BSA at pH = 7.5. The concentration of the complex in the tube was 1.2 mM. 500 U of urokinase enzyme were added to the complex solution.

For both solutions, relaxometric kinetic measurements were recorded every 2 min during 30 min, and then every 30 min during 3 h and finally 24 h after reaction began, by measuring the evolution of the longitudinal relaxation time (T_1) at 20MHz and 310K.

Partie expérimentale

7.4.6. Luminescence enzymatic assays

Fluorogenic caspase-3 substrate *N*-acetyl-DEVD-AFC was purchased from Sigma-Aldrich (ref. A0466). Fluorescence enzymatic assay was performed 50 mM HEPES buffer containing NaCl 100 mM and DTT 10 mM at pH = 7.4. for 0.7 μ M of *N*-acetyl-DEVD-AFC with 3.34×10^{-5} U of caspase-3. The enzymatic assay was monitored at 37°C, by recording fluorescence emission at 460 nm after excitation at 380 nm as a function of time. The caspase-3 inhibition test was recorded in the same conditions by adding increasing concentrations of **GdL₄** (100 μ M and 500 μ M).

Urokinase luminescent substrate *N*-CBZ-GGR-AMC was purchased from Sigma-Aldrich (ref. C9396). The fluorescence enzymatic assay was performed in 50mM potassium phosphate buffer containing 7mg/mL of BSA at pH = 7.5 for 0.5 μ M of *N*-CBZ-GGR-AMC with 0.5 U of urokinase. The enzymatic assay was monitored at 37 °C, by recording fluorescence emission at 440 nm after excitation at 365 nm in function of time. The urokinase inhibition test was recorded in the same conditions by adding increasing concentrations of **GdL₃** (5 μ M, 10 μ M, 50 μ M and 100 μ M).

7.5. Experimental procedures to Chapter 6

7.5.1. Synthesis

Synthesis of ligands **H₄L₅**, **H₄L₆** and **H₃L₇** were previously performed by Dr. Fabien Caillé in our group. **H₄L₅**, **H₄L₆** and **H₄L₇** ligands were synthesized as we have previously reported [5,6].

7.5.2. pH-potentiometric measurements

Potentiometric titrations were performed in order to determine protonation constants for the ligands (**H₄L₅**, **H₄L₆** and **H₃L₇**) and stability constants of the complexes formed with the metal ions of interest at different metal to ligand ratio 1:1 and 2:1. Titrations were carried by using NaCl ionic strength at 0.15 M concentration. The samples were thermostated at constant temperature of 25 °C, under nitrogen constant flow in order to provide inert atmosphere. Titrations were performed with NaOH solution (~0.2 M), the ligand concentration in the titrated solutions (in 6 mL total volume) was about 2 mM.

Titrations were done in the pH range of 2 to 12 or until metal hydroxide precipitation occurred (in the samples with metal excess). Extra volume of HCl was added to the starting solution to obtain a pH starting value of 2.

Partie expérimentale

The pH-potentiometric titrations were performed by employing a Metrohm 888 Titrand automatic titration system combined with a Metrohm combined electrode. H^+ ion concentrations were obtained through the measured pH using the calculation method proposed by Irving *et al* [2]. PESQUAD program was used for the calculation of the equilibrium constants.

7.5.3. 1H relaxometry

1H relaxometry measurements were performed using a Bruker Minispec MQ-20 NMR analyzer at 20 MHz and 25 °C. The temperature of the sample holder was set (25.0 ± 0.2 °C) and controlled with the use of a circulating water bath. The longitudinal relaxation times (T_1) were measured by using the inversion recovery method ($180^\circ - \tau - 90^\circ$) by averaging 5-6 data points obtained at 14 different τ values. The relaxivities of the complexes were determined according to a methodology slightly different from the standard procedure (by plotting the reciprocal longitudinal relaxation times of the complexes against their concentrations). Batch samples were prepared under argon atmosphere at 2.0 mM ligand concentration (the pH in these samples was kept constant at pH=6.70 with the use of HEPES buffer (I=0.15 M NaCl, 25 °C)). Various amounts of $MnCl_2$ were added to these solutions and longitudinal relaxation times of the solutions were measured. Because under these conditions only one Mn^{2+} ion containing species is present in solution in each system, (complexes of $[Mn(L)]$ composition) the curve obtained by plotting $1/T_{1p}$ for the samples with $[L] > [Mn^{2+}]$ as a function of Mn^{2+} concentration gives a straight line, with a slope that is equal to the relaxivity of the complex. Stability constants of Mn^{2+} complexes were determined by using 1H relaxometry. The T_1 longitudinal relaxation time of water protons was measured at 20MHz for different batch samples containing equimolar amounts of Mn^{2+} and H_4L_6 or H_3L_7 with 0.15 M NaCl and various amounts of acid covering the pH range of 1.75-10.96 for $[MnL_6]^{2-}$ and 2.03-11.06 for $[MnL_7]^-$.

7.5.4. UV-visible spectroscopy

For the stability constants of the $[CuL_5]^{2-}$, $[CuL_6]^{2-}$ and $[CuL_7]^-$ complexes, UV-visible absorption spectra were recorded on a PerkinElmer Lambda 19 spectrometer in the region $\lambda=350-875$ nm at 25 °C. Out-off-cell samples were prepared containing slight excess of the

Partie expérimentale

ligand, the metal Cu^{2+} (2.5 mM), 1 M NaCl and different HCl concentrations varying in the 5-500 mM range. The samples were equilibrated few days before the measurements take place. Concerning the kinetic experiments, the rates of the metal exchange reactions of the Mn^{2+} complexes were too fast to be followed using a standard UV-spectrometric method. The dissociation of $[\text{MnL}_5]^{2-}$, $[\text{MnL}_6]^{2-}$ and $[\text{MnL}_7]^-$ complexes was investigated using a stopped-flow technique (Applied Photophysics DX-17MV stopped-flow machine). The decomplexation reactions were followed at 300 nm in the pH range of 3.4-4.9 by using N-methylpiperazine (NMP, 20 mM) buffer. The concentration of the complexes was 0.5 mM, while the concentration of the Cu^{2+} was 10 to 40 times higher, in order to ensure pseudo-first-order conditions. The temperature was maintained at 25°C and the ionic strength of the solutions was also kept constant 0.15 M NaCl. The pseudo-first-order rate constants (k_{obs}) were calculated by fitting the absorbance-time data to the following equation:

$$A_t = (A_0 - A_e)e^{-k_{\text{obs}} t} + A_e$$

A_t , A_0 and A_e are the absorbance at time t , at the start and at equilibrium of the reactions, respectively. The calculations were performed with the computer program Scientist, by using a standard least-squares procedure.

The ^1H NMRD profiles of aqueous $[\text{MnL}_7]^-$ complex solution ($c_{\text{Mn}^{2+}} = 1.87$ mM, pH 7.2) were measured at 25 and 37 °C on a Stelar SMARTracer Fast Field Cycling NMR relaxometer (0.00024–0.24 T, 0.01–10 MHz ^1H Larmor frequency) and a Bruker WP80 NMR electromagnet adapted to variable-field measurements (0.47–1.88 T, 20–80 MHz ^1H Larmor frequency), and controlled by the SMARTracer PC-NMR console. The temperature was controlled by a VTC91 temperature control unit and maintained by a gas flow. The temperature was determined according to previous calibration with a Pt resistance temperature probe. The relaxivities at 400 MHz were obtained on a Bruker Advanced 400 MHz spectrometer using a 5mm BBFO probe.

7.5.5. ^{17}O NMR measurements

Variable-temperature ^{17}O NMR measurements of aqueous solutions of $[\text{MnL}_7]^-$ ($c_{\text{MnL}} = 3.78$ mmol kg^{-1} , pH 7.2 (for T2 measurements) and $c_{\text{MnL}} = 37.91$ mmol kg^{-1} , pH 7.7 (for shift measurements)) were performed on a Bruker Advanced 400 MHz spectrometer using a 10mm BBFO probe (9.4 T, 54.2 MHz) in the temperature range 1–75 °C. The temperature

Partie expérimentale

was calculated according to previous calibration with ethylene glycol and MeOH [7]. The corresponding $[\text{ZnL}_7]^-$ complex at identical concentration and pH was used as diamagnetic reference. The ^{17}O transverse (T_2) relaxation times were obtained by the Carl-Purcell-Meiboom-Gill spin-echo technique [8]. To eliminate the susceptibility corrections to the chemical shifts [9], the sample was placed in a glass sphere fixed in a 10 mm NMR tube. To improve sensitivity, the amount of ^{17}O was enriched by adding H_2^{17}O (10 % H_2^{17}O , CortecNet) to achieve approximately 1 % ^{17}O content in the sample. ^{17}O NMR measurements were performed by Agnès Pallier at the CBM.

7.6. References

- (1) He, J.; Bonnet, C. S.; Eliseeva, S. V.; Lacerda, S.; Chauvin, T.; Retailleau, P.; Szeremeta, F.; Badet, B.; Petoud, S.; Tóth, É.; Durand, P.: Prototypes of Lanthanide(III) Agents Responsive to Enzymatic Activities in Three Complementary Imaging Modalities: Visible/Near-Infrared Luminescence, PARACEST-, and T1-MRI. *Journal of the American Chemical Society* **2016**.
- (2) Irving, H. M.; Miles, M. G.; Pettit, L. D.: A study of some problems in determining the stoichiometric proton dissociation constants of complexes by potentiometric titrations using a glass electrode. *Analytica Chimica Acta* **1967**, *38*, 475-488.
- (3) Kupihár, Z.; Schmél, Z.; Kele, Z.; Penke, B.; Kovács, L.: Synthesis and application of a novel, crystalline phosphoramidite monomer with Thiol Terminus, suitable for the synthesis of DNA conjugates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2001**, *9*, 1241-1247.
- (4) Peterson, Q. P.; Goode, D. R.; West, D. C.; Botham, R. C.; Hergenrother, P. J.: Preparation of the caspase-3/7 substrate Ac-DEVD-pNA by solution-phase peptide synthesis. *Nature Protocols* **2010**, 294.
- (5) Pellegatti, L.; Zhang, J.; Drahos, B.; Villette, S.; Suzenet, F.; Guillaumet, G.; Petoud, S.; Toth, E.: Pyridine-based lanthanide complexes: towards bimodal agents operating as near infrared luminescent and MRI reporters. *Chemical communications* **2008**, 6591-3.
- (6) Bonnet, C. S.; Caille, F.; Pallier, A.; Morfin, J. F.; Petoud, S.; Suzenet, F.; Toth, E.: Mechanistic studies of $\text{gd}(3+)$ -based MRI contrast agents for $\text{zn}(2+)$ detection: towards rational design. *Chemistry* **2014**, *20*, 10959-69.
- (7) Raiford, D. S.; Fisk, C. L.; Becker, E. D.: Calibration of methanol and ethylene glycol nuclear magnetic resonance thermometers. *Analytical Chemistry* **1979**, *51*, 2050-2051.
- (8) Meiboom, S.; Gill, D.: Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times. *Review of Scientific Instruments* **1958**, *29*, 688-691.
- (9) Hugi, A. D.; Helm, L.; Merbach, A. E.: Water Exchange on Hexaaquavanadium(III): a Variable-Temperature and Variable-Pressure ^{17}O -NMR Study at 1.4 and 4.7 Tesla. *Helvetica Chimica Acta* **1985**, *68*, 508-521

Annexes

Table des matières

8.1.	Equations used for treatment of the relaxometric data	257
8.2.	LC/MS spectra of complexes from Chapter 2	260
8.3.	LC/MS spectra of complexes from Chapter 4	283

8.1. Equations used for treatment of the relaxometric data

^{17}O NMR data have been fitted according to the Swift and Connick equations [1]. The reduced transverse ^{17}O relaxation rates, $1/T_{2r}$, and reduced ^{17}O chemical shifts, ω_r , have been calculated from the measured relaxation rates $1/T_2$ and angular frequencies ω of the paramagnetic solutions and from the relaxation rates $1/T_{2A}$ and angular frequencies ω_A of the diamagnetic reference according to the **equations (1) and (2)**:

$$\frac{1}{T_{2r}} = \frac{1}{P_m} \left[\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_{2A}} \right] = \frac{1}{\tau_m} \frac{T_{2m}^{-2} + \tau_m^{-1} T_{2m}^{-1} + \Delta\omega_m^2}{(\tau_m^{-1} + T_{2m}^{-1})^2 + \Delta\omega_m^2} \quad (1)$$

$$\Delta\omega_r = \frac{1}{P_m} (\omega - \omega_A) = \frac{\Delta\omega_m}{(1 + \tau_m T_{2m}^{-1})^2 + \tau_m^2 \Delta\omega_m^2} \quad (2)$$

$\Delta\omega_m$ is determined by the hyperfine or scalar coupling constant, A_0/\hbar , where B represents the magnetic field, S is the electron spin and g_L is the isotropic Landé g factor (**equation (3)**).

$$\Delta\omega_m = \frac{g_L \mu_B S(S+1) B A_0}{3k_B T \hbar} \quad (3)$$

The ^{17}O transverse relaxation rate is mainly determined by the scalar contribution, $1/T_{2sc}$, and it is given by **equation (4)**.

$$\frac{1}{T_{2m}} \cong \frac{1}{T_{2sc}} = \frac{S(S+1)}{3} \left(\frac{A_0}{\hbar} \right)^2 \tau_s \quad \frac{1}{\tau_s} = \frac{1}{\tau_m} + \frac{1}{T_{1e}} \quad (4)$$

The exchange rate, k_{ex} , (or inverse binding time, τ_m) of the inner sphere water molecule is assumed to obey the Eyring equation (**equation (5)**) where ΔS^\ddagger and ΔH^\ddagger are the entropy and enthalpy of activation for the exchange, and $^{298}k_{ex}$ is the exchange rate at 298.15 K.

$$\frac{1}{\tau_m} = k_{ex} = \frac{k_B T}{h} \exp \left\{ \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} \right\} = \frac{k_{ex}^{298} T}{298.15} \exp \left\{ \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \left(\frac{1}{298.15} - \frac{1}{T} \right) \right\} \quad (5)$$

The electronic relaxation is mainly governed by modulation of the transient zero-field splitting, and for the electron spin relaxation rates, $1/T_{1e}$ and $1/T_{2e}$, McMachlan has developed **equations (6)–(8)** [2]:

$$\left(\frac{1}{T_{1e}} \right) = \frac{32}{25} \Delta^2 \left(\frac{\tau_v}{1 + \omega_S^2 \tau_v^2} + \frac{4\tau_v}{1 + 4\omega_S^2 \tau_v^2} \right) \quad (6)$$

Annexes

$$\left(\frac{1}{T_{2e}}\right) = \frac{32}{50} \Delta^2 \left[3\tau_v + \frac{5\tau_v}{1 + \omega_S^2 \tau_v^2} + \frac{2\tau_v}{1 + 4\omega_S^2 \tau_v^2} \right] \quad (7)$$

$$\tau_v = \tau_v^{298} \exp\left\{\frac{E_v}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{298.15}\right)\right\} \quad (8)$$

where Δ^2 is the trace of the square of the transient zero-field-splitting (ZFS) tensor, τ_v is the correlation time for the modulation of the ZFS with the activation energy E_v , and ω_S is the Larmor frequency of the electron spin.

For the fit of the ^{17}O T_2 data, we used an exponential function to treat the temperature dependency of $1/T_{1e}$:

$$\frac{1}{T_{1e}} = \frac{1}{T_{1e}^{298}} \exp\left\{\frac{E_v}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{298.15}\right)\right\} \quad (9)$$

The proton relaxivities (normalized to 1 mM Mn^{2+} concentration) originate from inner- and outer-sphere contributions (**equation (10)**):

$$r_1 = r_{\text{is}} + r_{\text{os}} \quad (10)$$

The inner-sphere term is given by **equation (11)**, where q is the number of inner-sphere water molecules.

$$r_{\text{is}} = \frac{1}{1000} \times \frac{q}{55.55} \times \frac{1}{T_{\text{im}}^{\text{H}} + \tau_m} \quad (11)$$

In the longitudinal relaxation rate of inner sphere water protons, $1/T_{\text{im}}^{\text{H}}$, the dipolar contribution dominates (**equation (12)**):

$$\frac{1}{T_{\text{im}}^{\text{H}}} \cong \frac{1}{T_1^{\text{DD}}} = \frac{2}{15} \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\hbar^2 \gamma_S^2 \gamma_I^2}{r_{\text{MnH}}^6} S(S+1) \left[\frac{3\tau_{\text{d1H}}}{1 + \omega_I^2 \tau_{\text{d1H}}^2} + \frac{7\tau_{\text{d2H}}}{1 + \omega_S^2 \tau_{\text{d2H}}^2} \right] \quad (12)$$

Here r_{MnH} is the effective distance between the Mn^{2+} electron spin and the water protons, ω_I is the proton resonance frequency, τ_{d1H} is given by **equation (12)**, where τ_{RH} is the rotational correlation time of the Mn^{2+} - H_{water} vector (**equation (13)**):

$$\frac{1}{\tau_{\text{d}i\text{H}}} = \frac{1}{\tau_m} + \frac{1}{\tau_{RH}} + \frac{1}{T_{ie}} \quad i = 1, 2; \quad (13)$$

$$\tau_{RH} = \tau_{RH}^{298} \exp\left\{\frac{E_R}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{298.15}\right)\right\} \quad (14)$$

The outer-sphere contribution to the overall relaxivity is described by **equation (15)**, where N_A is the Avogadro constant, and J_{os} is a spectral density function (**equation (16)**).

$$r_{ios} = \frac{32N_A\pi}{405} \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\hbar^2 \gamma_S^2 \gamma_I^2}{a_{MnH} D_{MnH}} S(S+1) [3J_{os}(\omega_I, T_{1e}) + 7J_{os}(\omega_S, T_{2e})] \quad (15)$$

$$J_{os}(\omega, T_{je}) = \text{Re} \left[\frac{1 + \frac{1}{4} \left(i\omega \tau_{MnH} + \frac{\tau_{MnH}}{T_{je}} \right)^{1/2}}{1 + \left(i\omega \tau_{MnH} + \frac{\tau_{MnH}}{T_{je}} \right)^{1/2} + \frac{4}{9} \left(i\omega \tau_{MnH} + \frac{\tau_{MnH}}{T_{je}} \right) + \frac{1}{9} \left(i\omega \tau_{MnH} + \frac{\tau_{MnH}}{T_{je}} \right)^{3/2}} \right] \quad (16)$$

$j = 1, 2$

The diffusion coefficient for the diffusion of a water proton away from a Mn^{2+} complex, D_{MnH} , obeys the exponential temperature dependence described by **equation (17)**, with activation energy E_{MnH} :

$$D_{MnH} = D_{MnH}^{298} \exp\left\{\frac{E_{MnH}}{R} \left(\frac{1}{298.15} - \frac{1}{T}\right)\right\} \quad (17)$$

- (1) Swift, J. T; Connick, R. E. *J. Chem. Phys.* **1962**, 37, 307–320.
- (2) McLachlan, A. D. *Proc. R. Soc. London, Ser. A.* **1964**, 280, 271–288.

8.2. LC/MS spectra of complexes from Chapter 2

Characterization of the studied complexes was performed at the ICSN as well. Recorded HPLC chromatograms and Mass spectra are presented below.

For each studied compounds, the following conditions were used:

Column: Hypersil C 18, 5 μ m, 150*4.6 mm

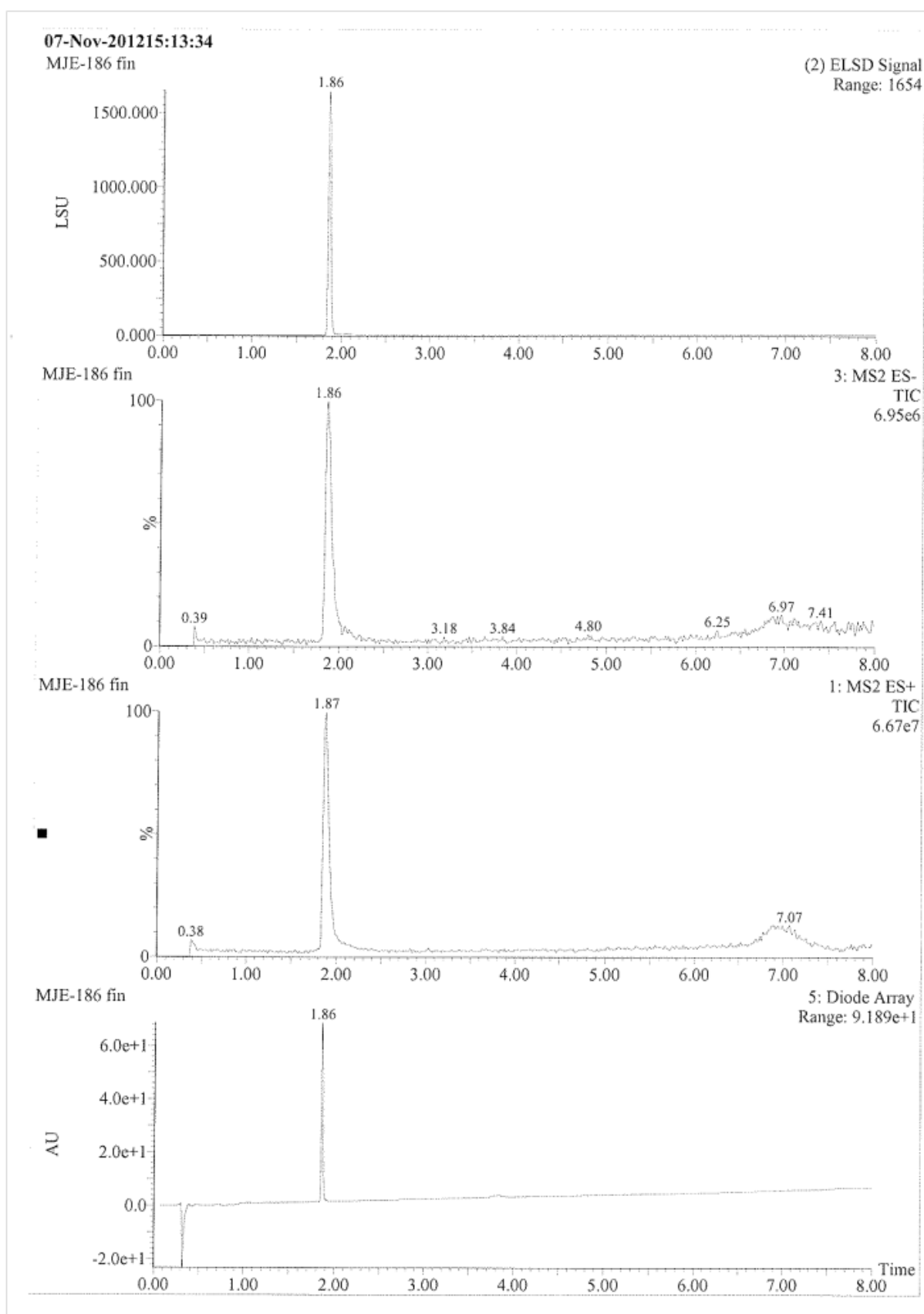
Injection Volume: 10.00 μ L

Solvents: A: H₂O 0.1% Formic acid; B: CH₃CN 0.1% Formic acid

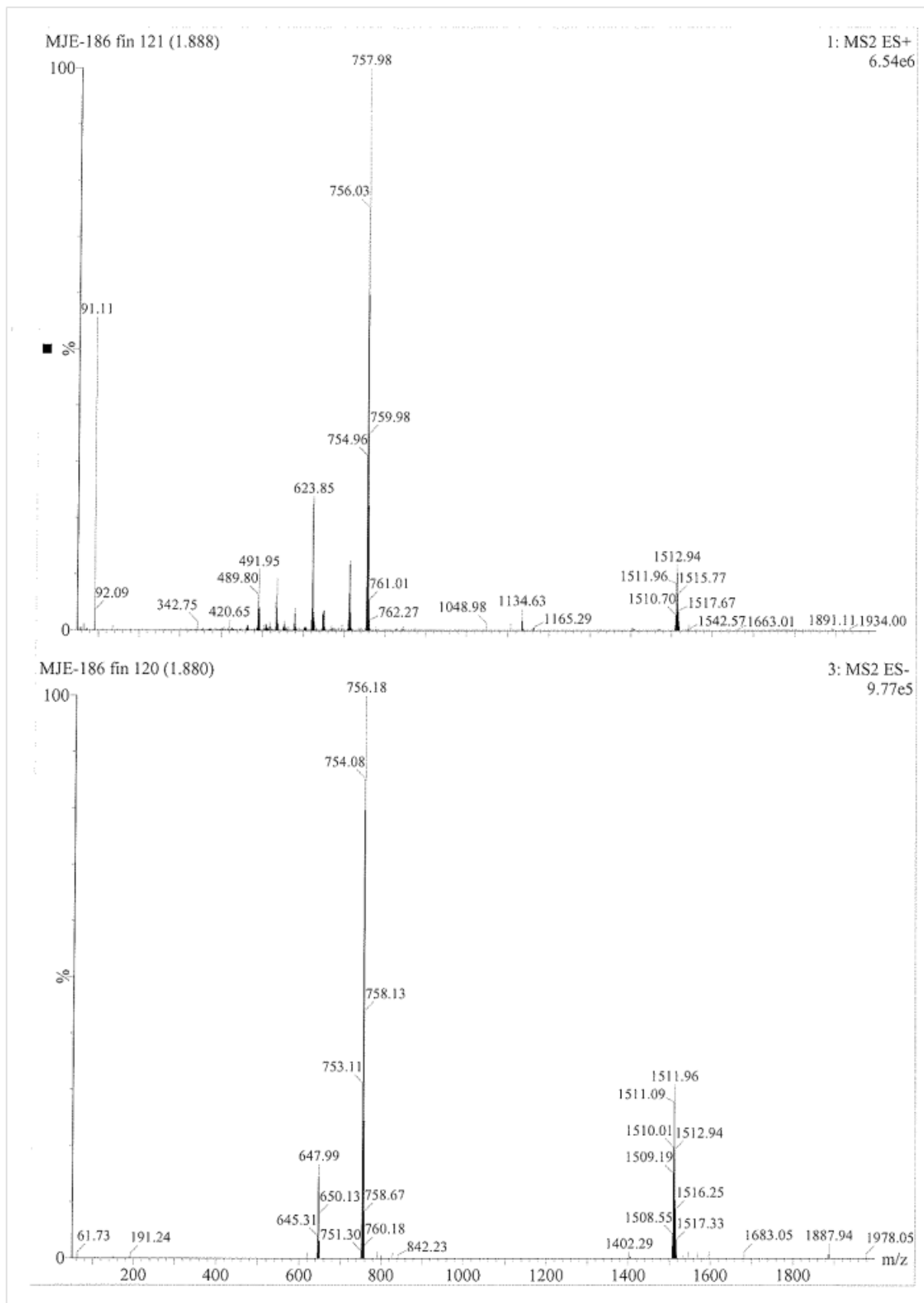
The HPLC chromatograms were respectively recorded using Light Scattering detection, 254 nm UV and Mass spectrometry detection with Electrospray ionization in both positive and negative modes.

Annexes

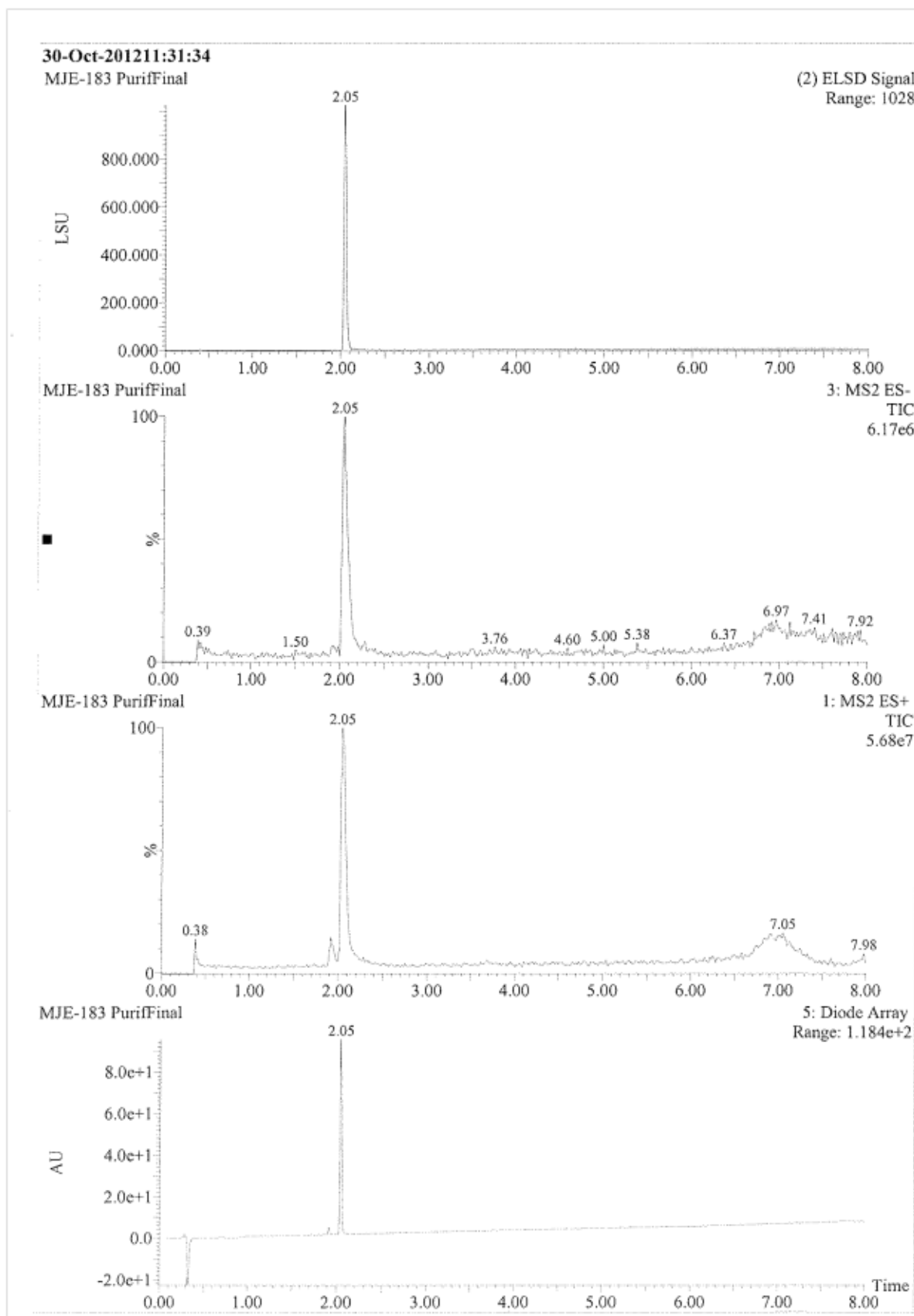
HPLC and ESI-MS spectra of **Yb(DO3A-Py-Cbz(3))** :



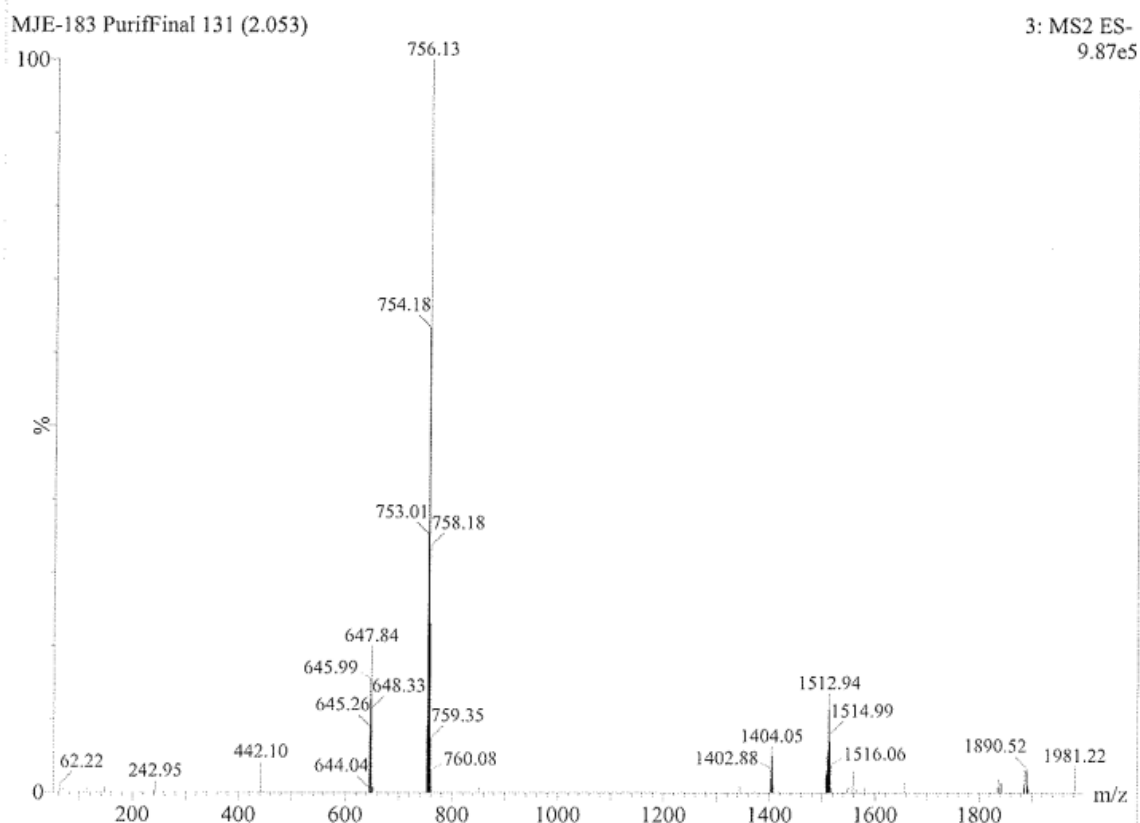
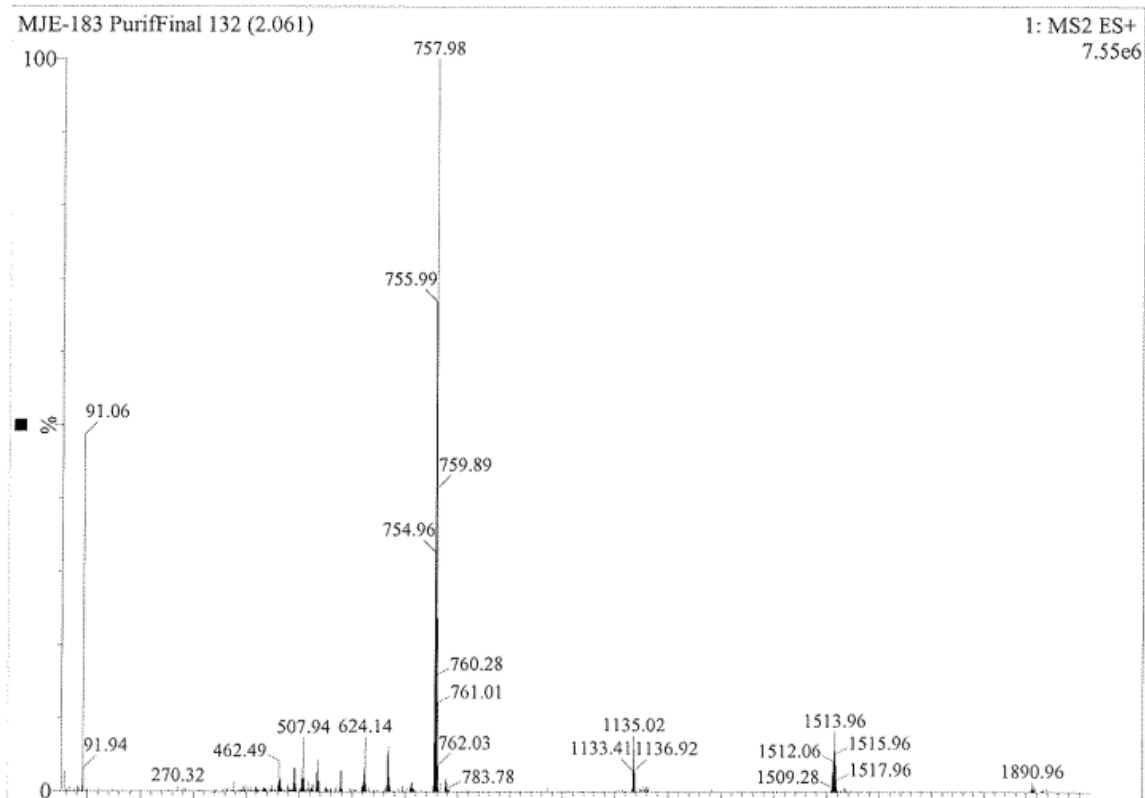
Annexes



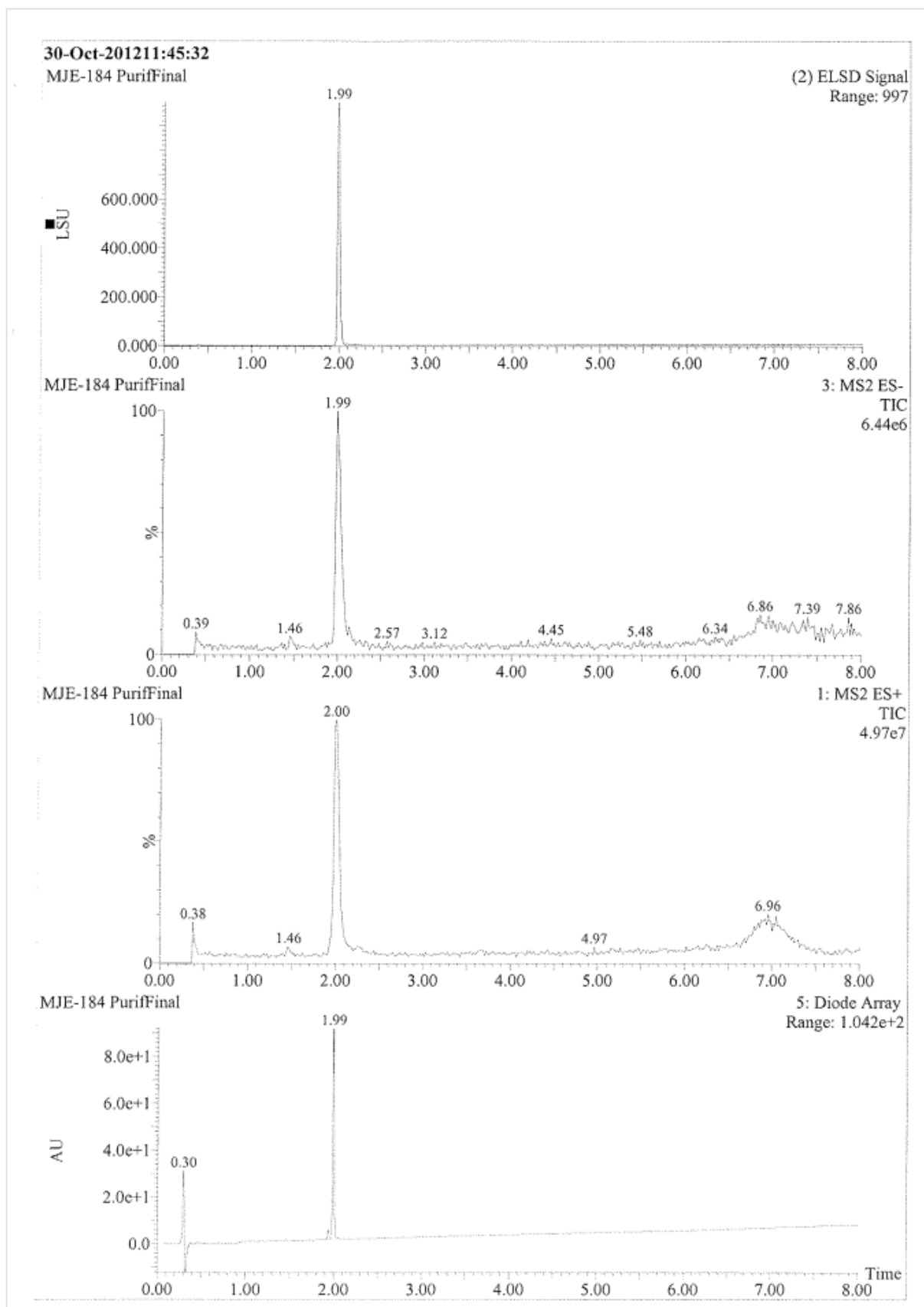
HPLC and ESI-MS spectra of **Yb(DO3A-Py-Cbz(4))** :

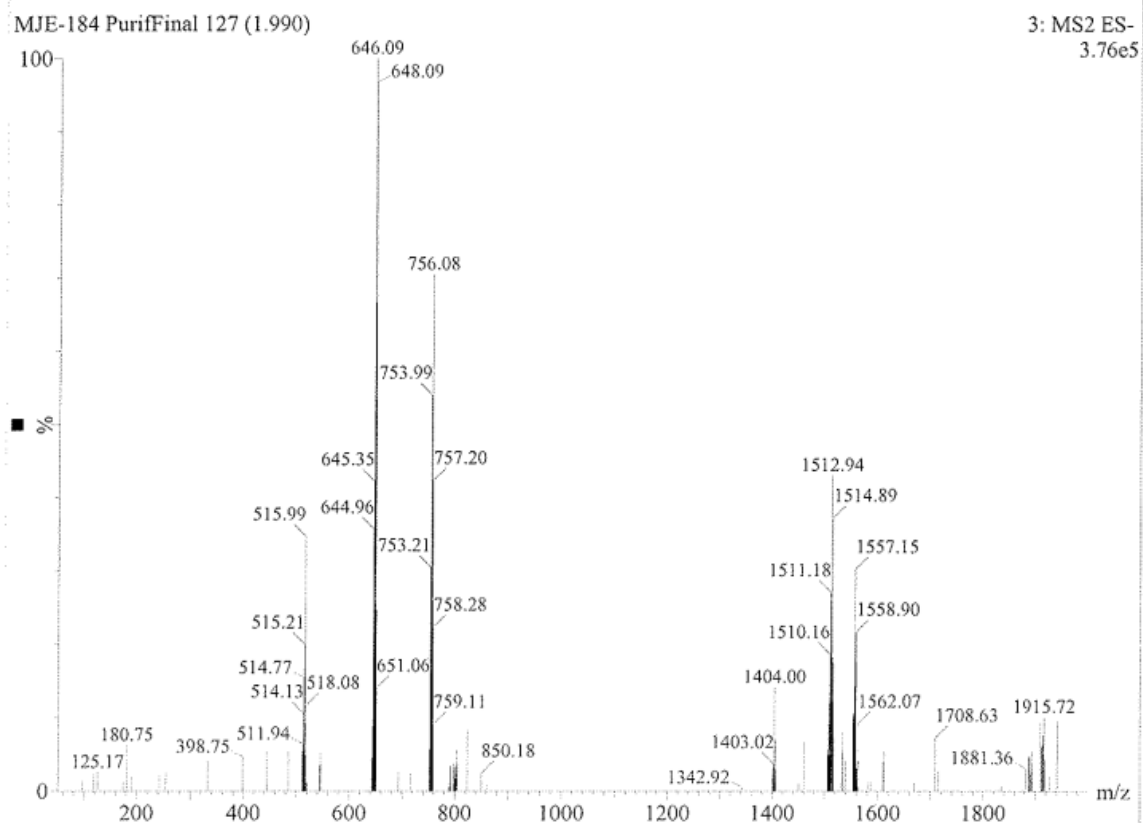
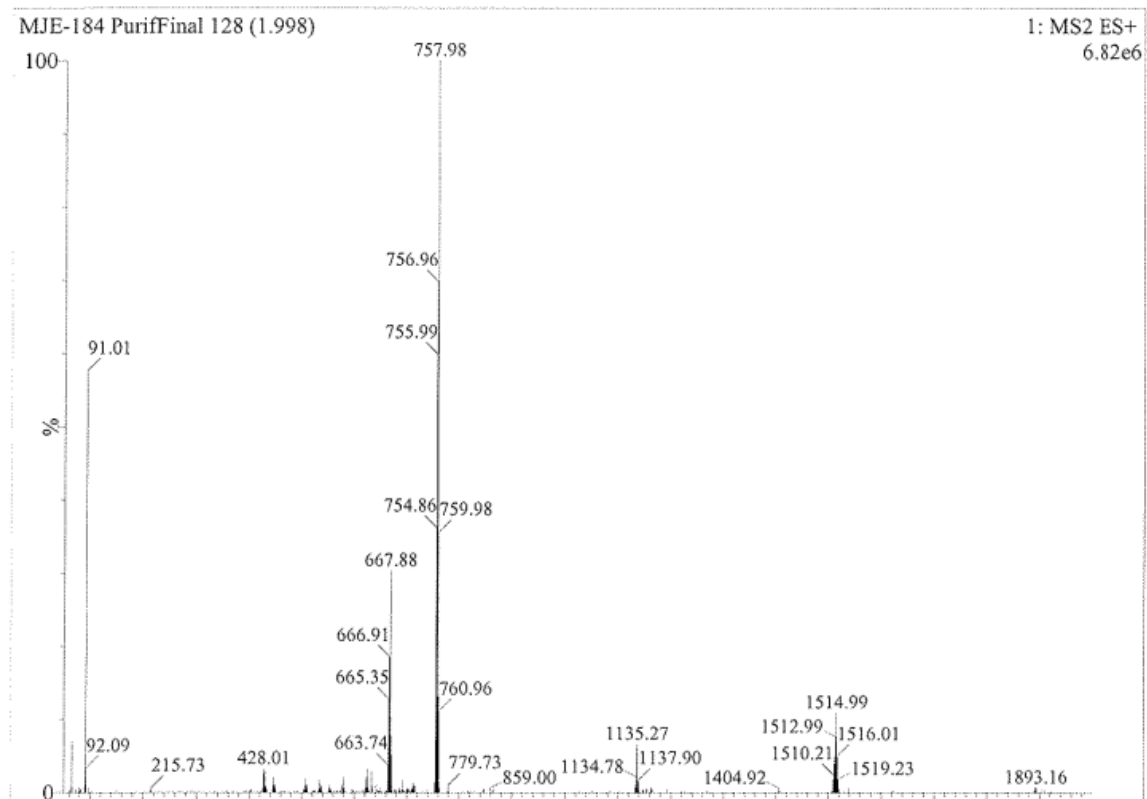


Annexes

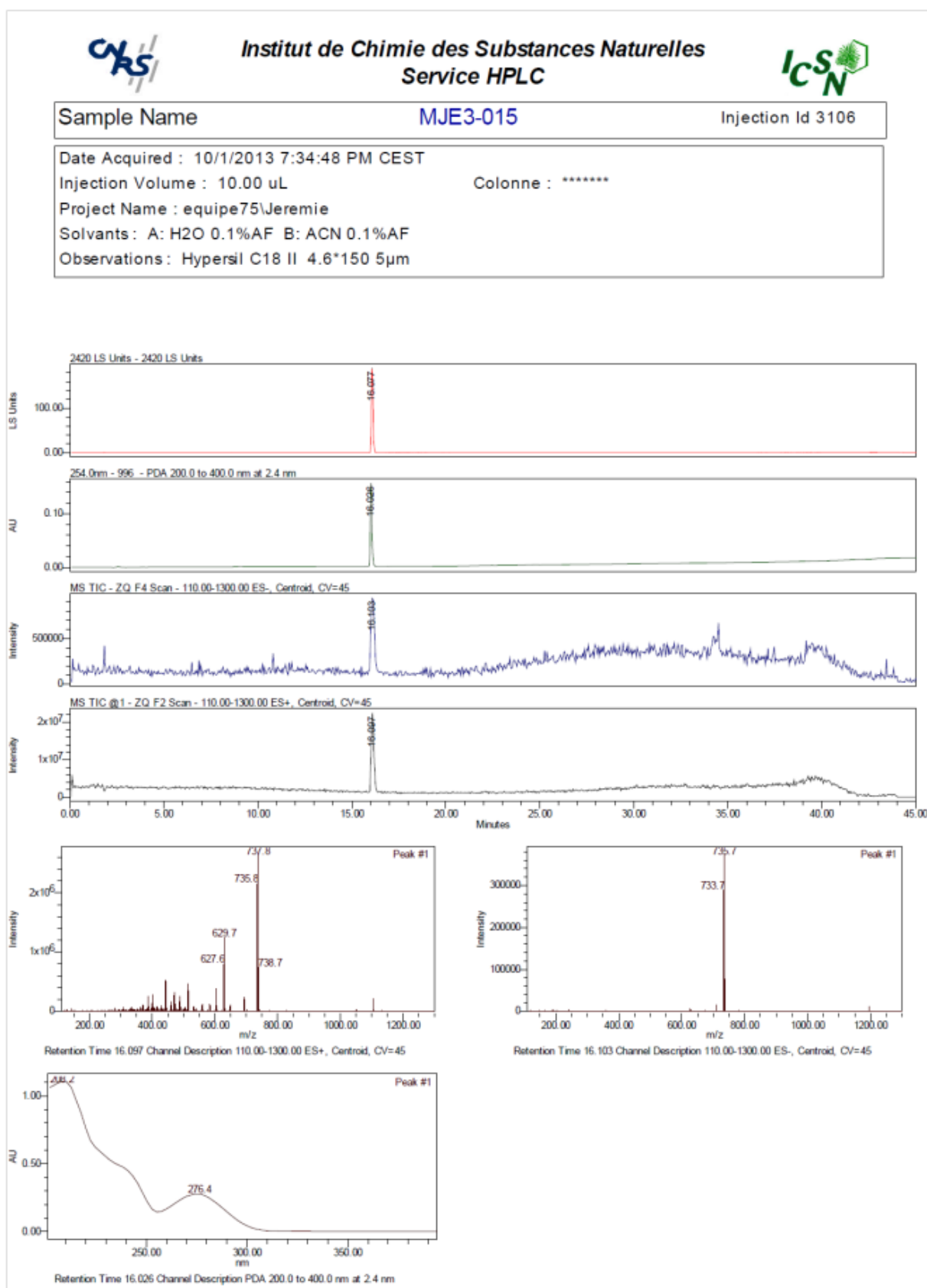


HPLC and ESI-MS spectra of **Yb(DO3A-Py-Cbz(5))** :

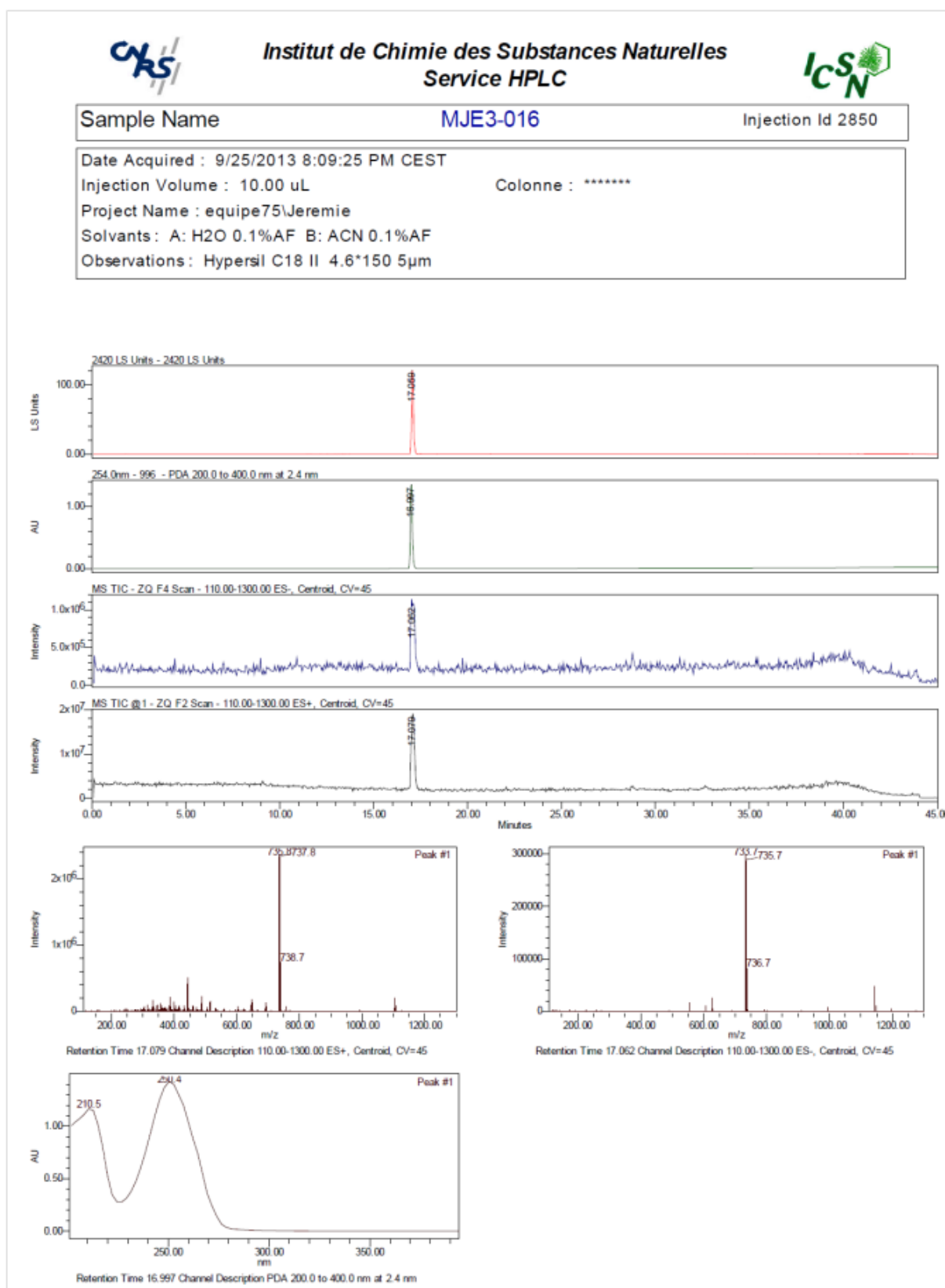




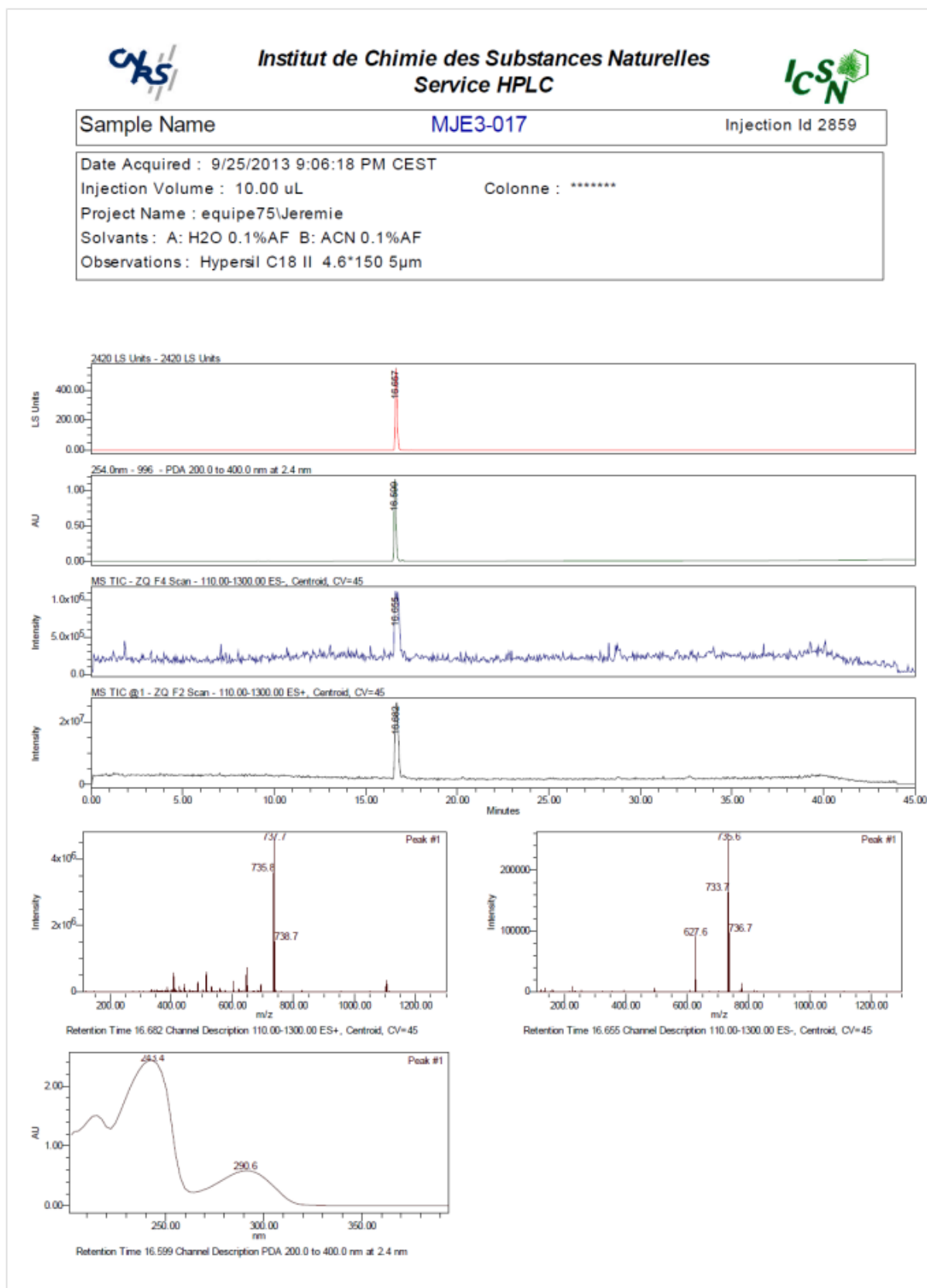
HPLC/MS and UV spectra of **Eu(DO3A-Py-Cbz(3))** :



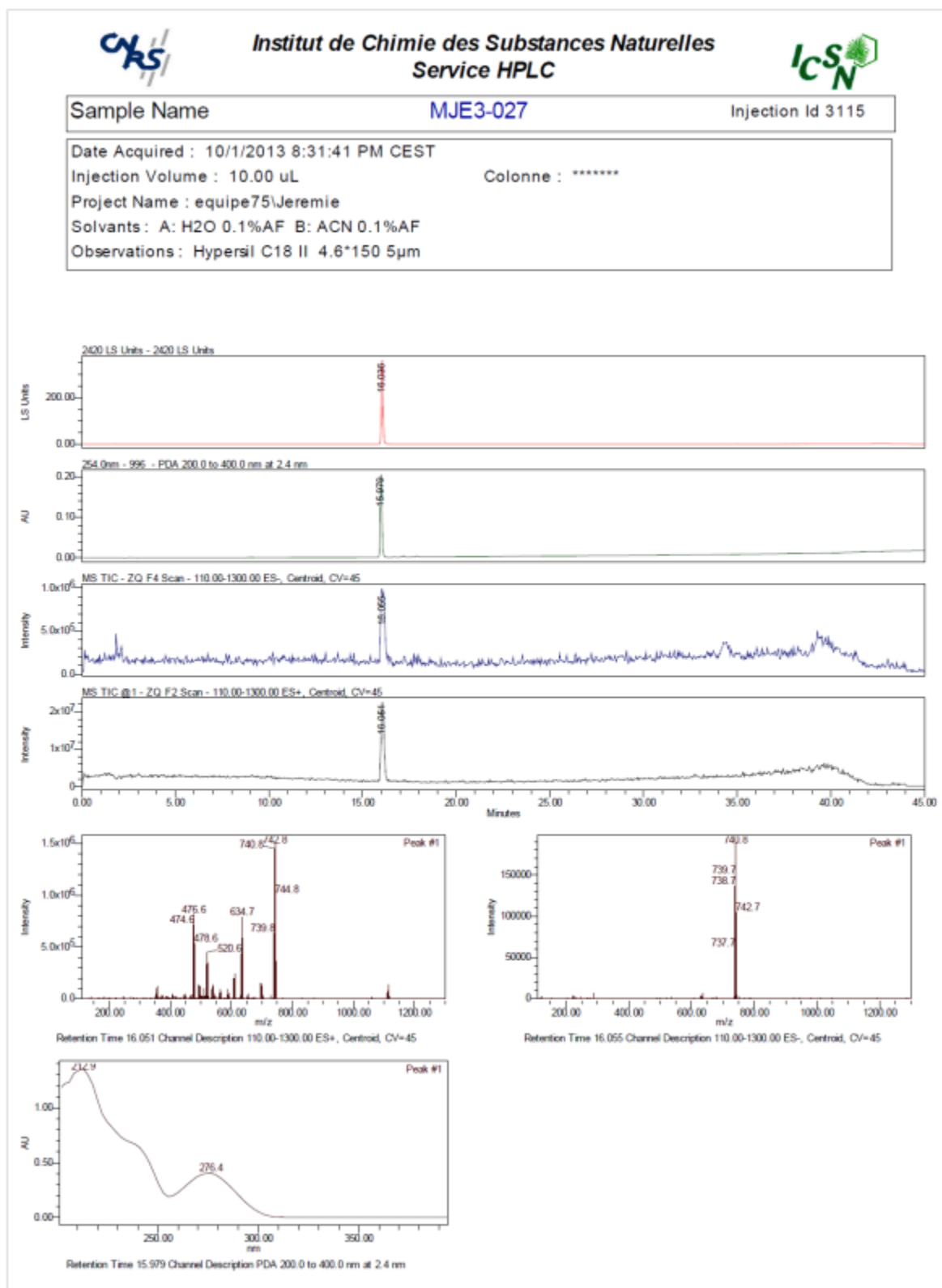
HPLC/MS and UV spectra of Eu(DO3A-Py-Cbz(4)) :



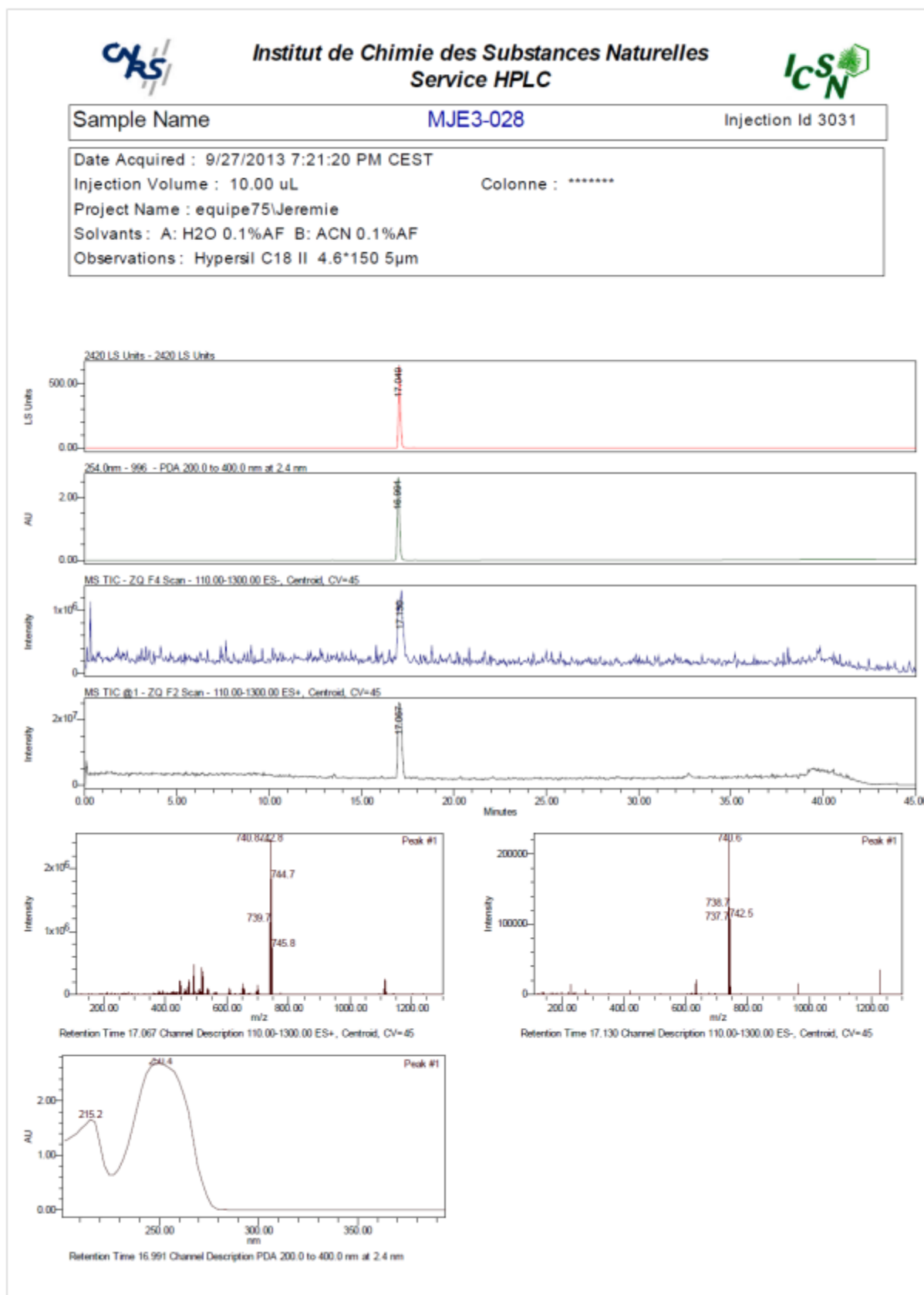
HPLC/MS and UV spectra of **Eu(DO3A-Py-Cbz(5))** :



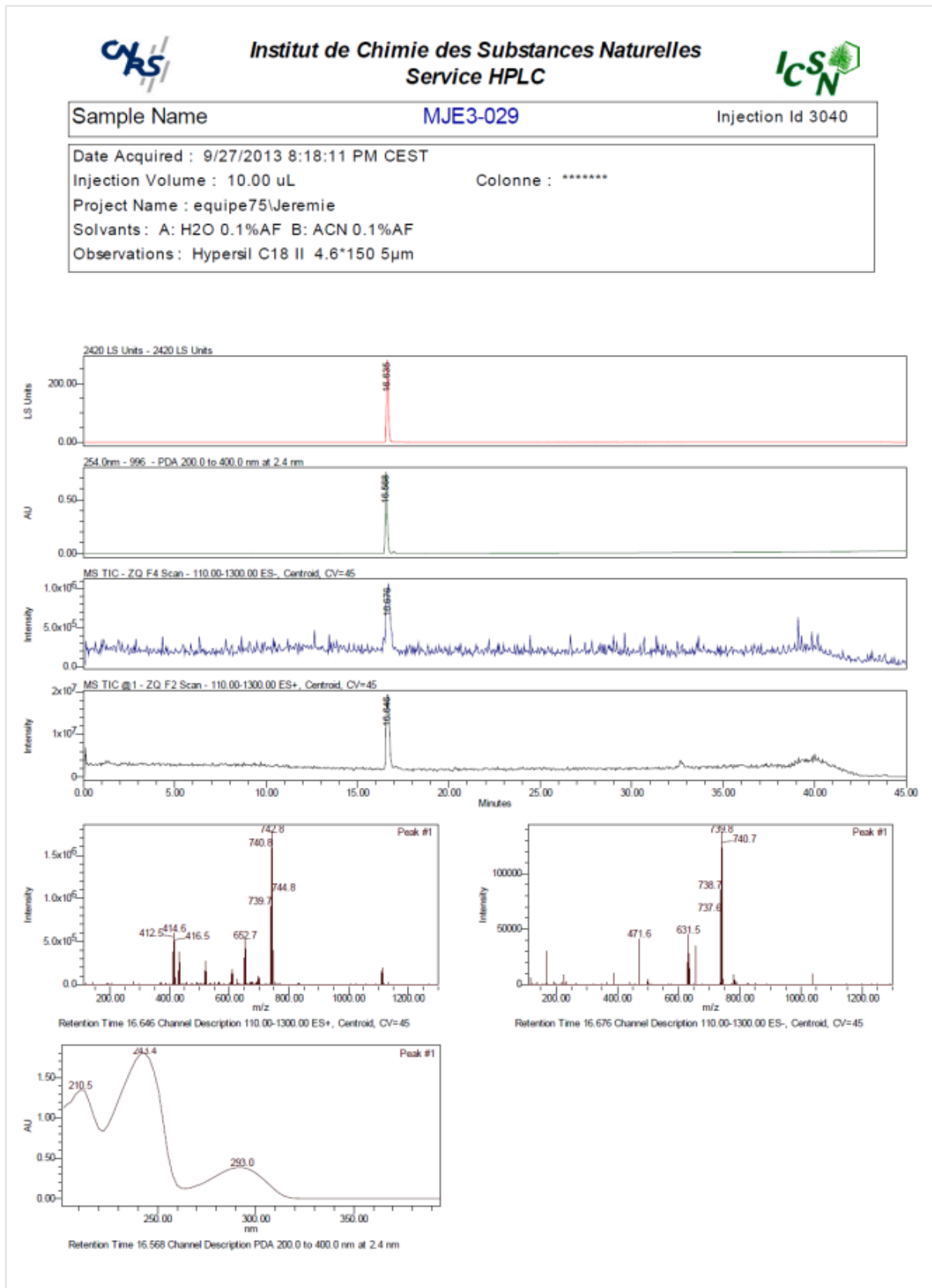
HPLC/MS and UV spectra of **Gd(DO3A-Py-Cbz(3))** :



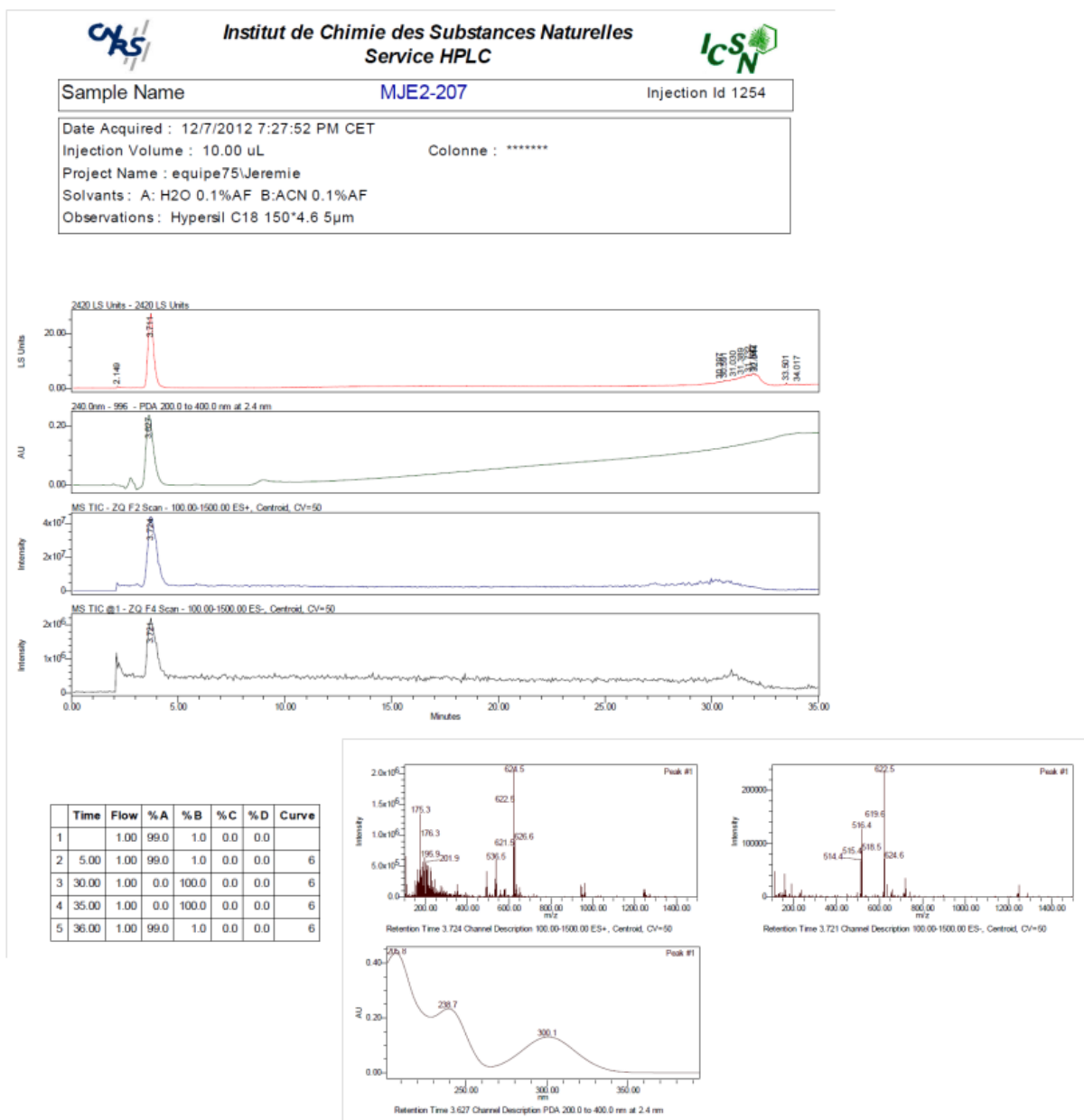
HPLC/MS and UV spectra of **Gd(DO3A-Py-Cbz(4))** :



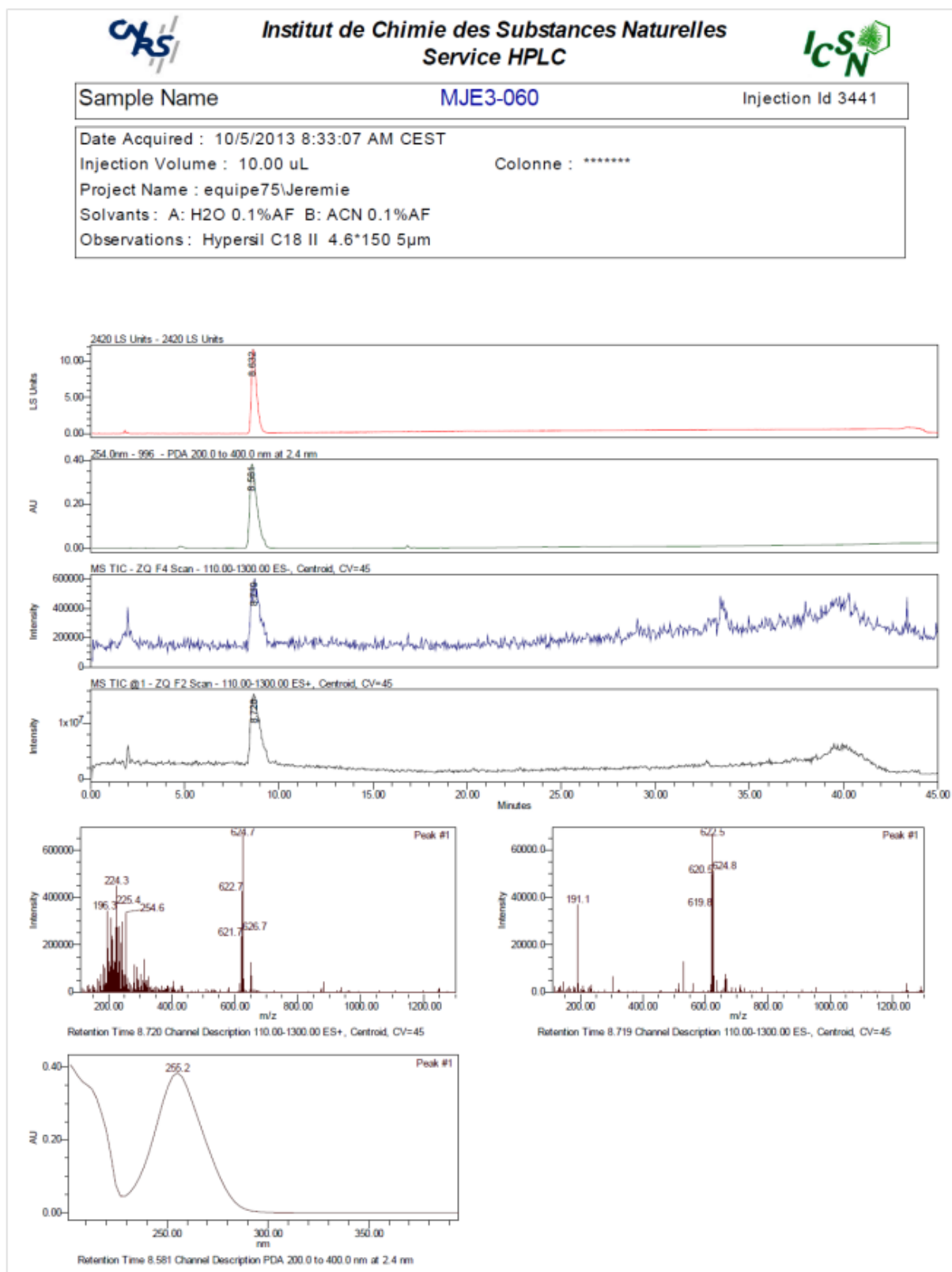
HPLC/MS and UV spectra of **Gd(DO3A-Py-Cbz(5))** :



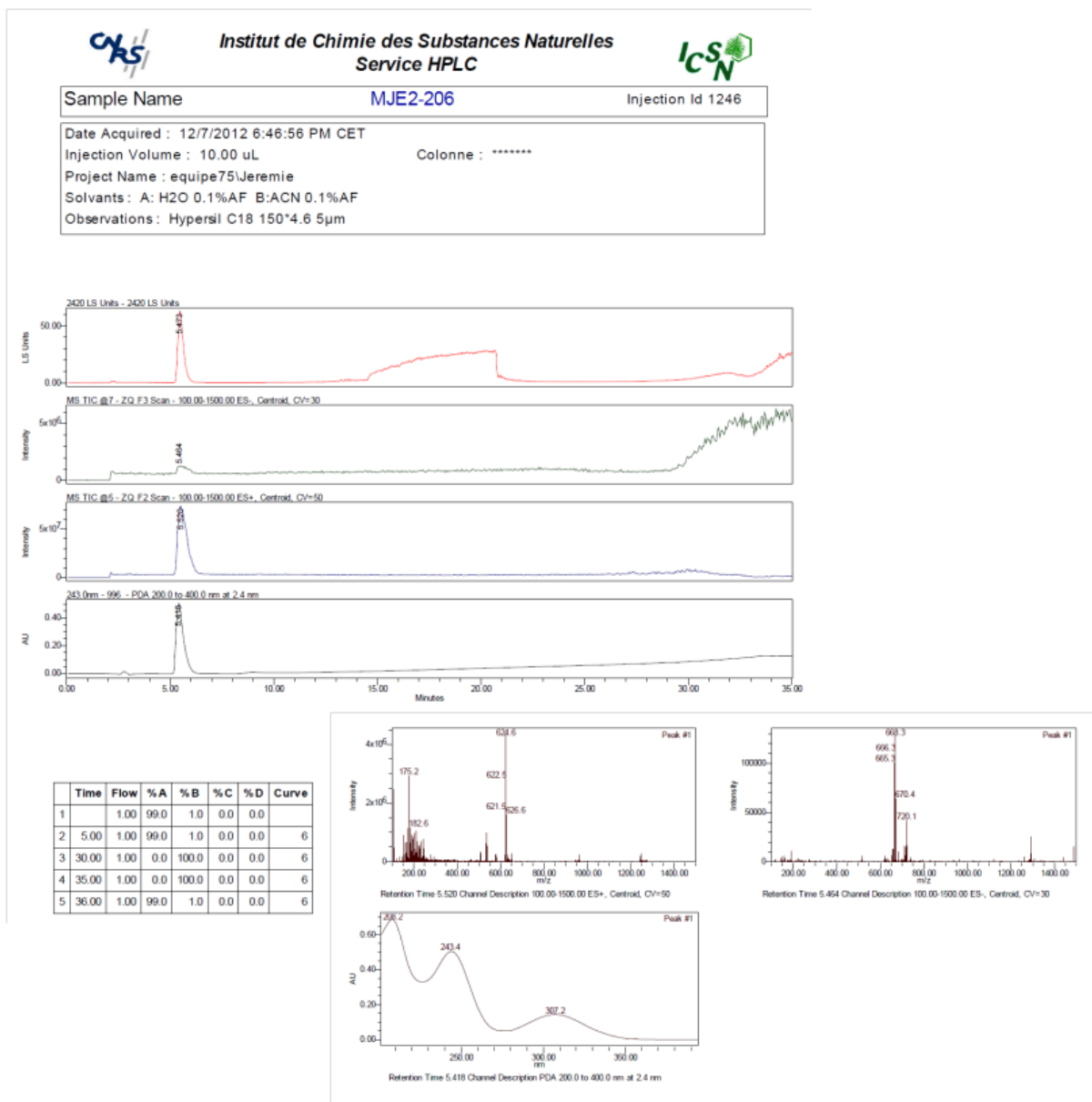
HPLC/MS and UV spectra of **Yb(DO3A-Py-NH₂(3))** :



HPLC/MS and UV spectra of **Yb(DO3A-Py-NH₂(4))** :

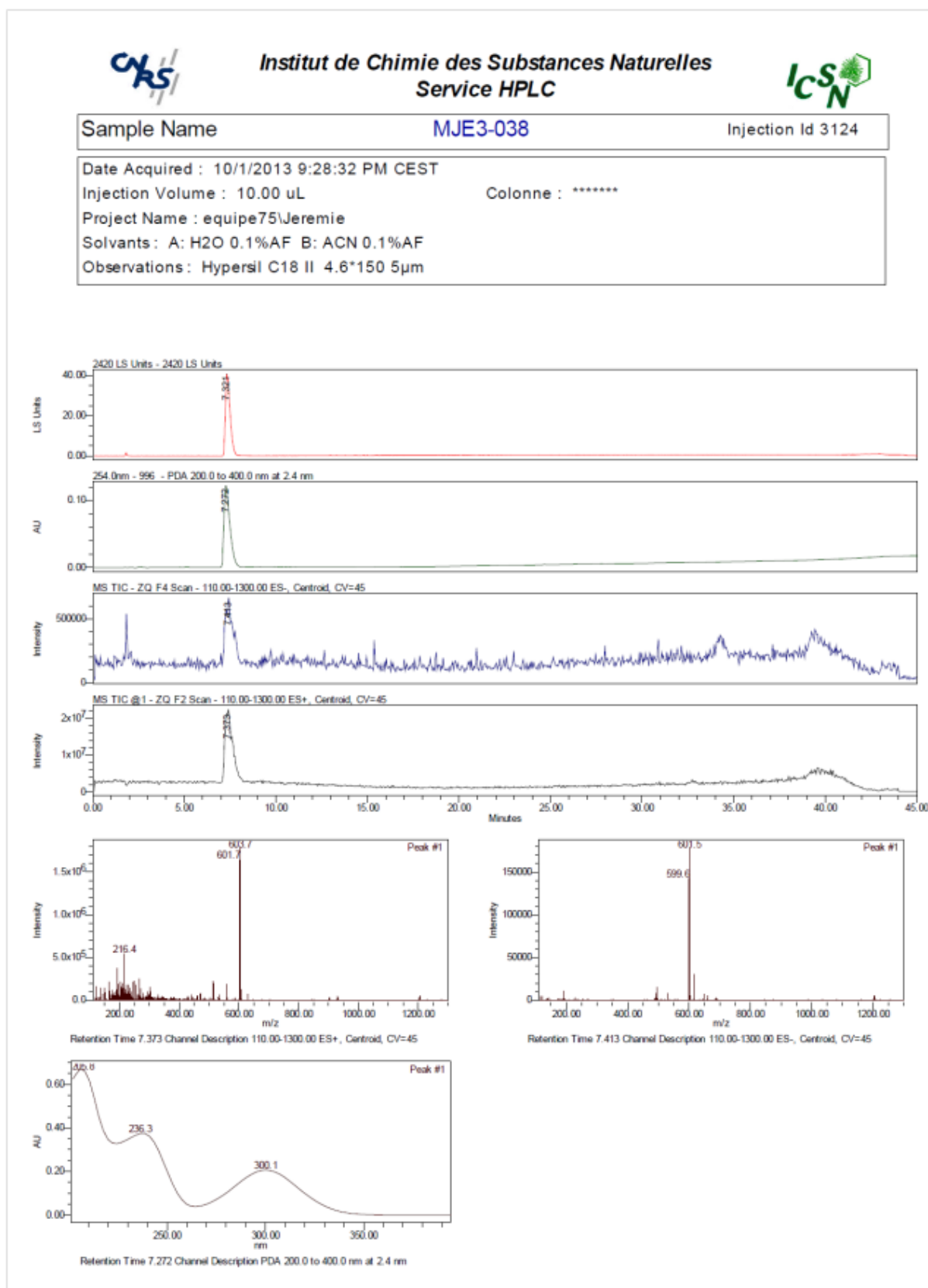


HPLC/MS and UV spectra of **Yb(DO3A-Py-NH₂(5))** :

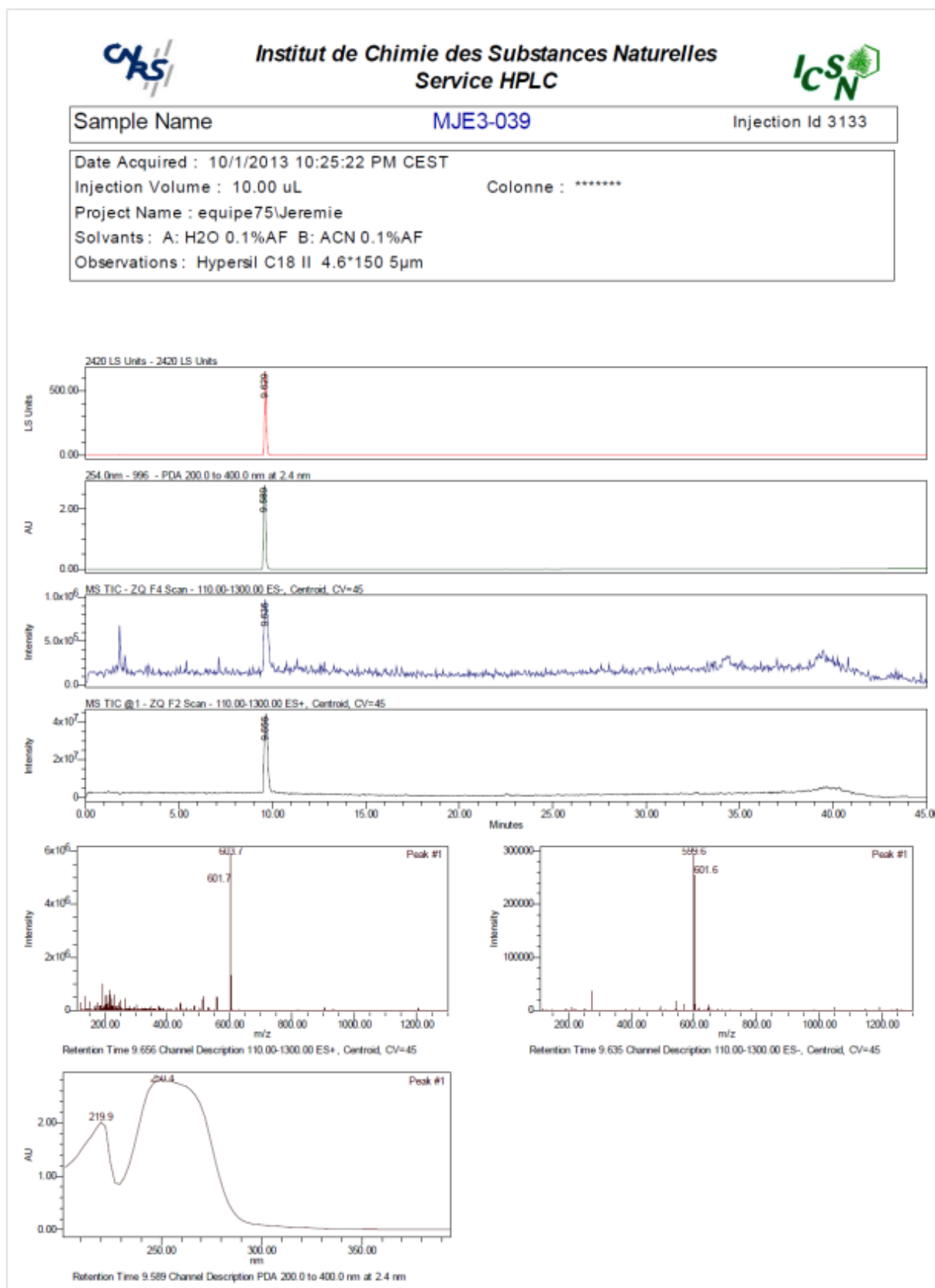


Annexes

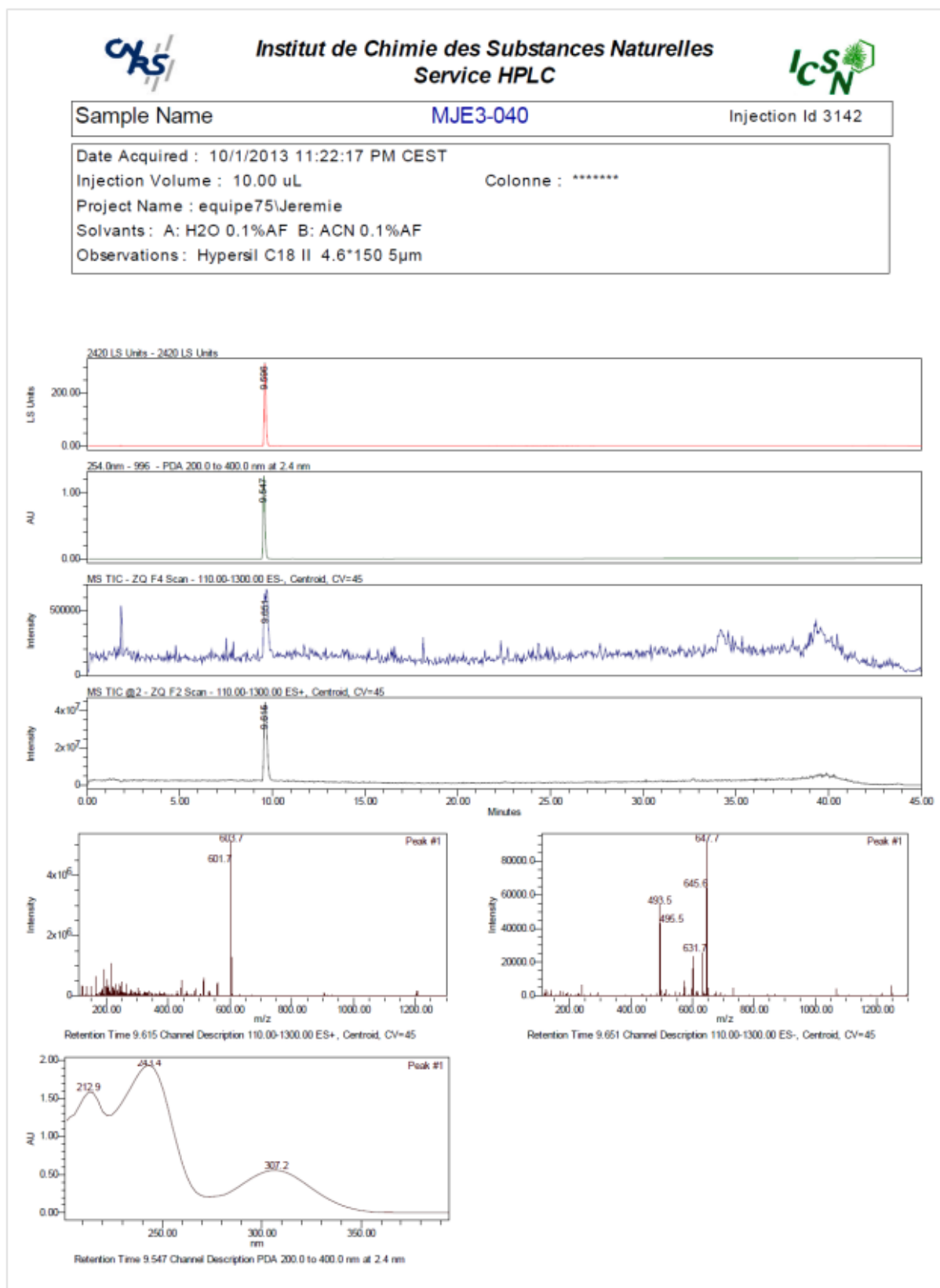
HPLC/MS and UV spectra of **Eu(DO3A-Py-NH₂(3))** :



HPLC/MS and UV spectra of **Eu(DO3A-Py-NH₂(4))** :

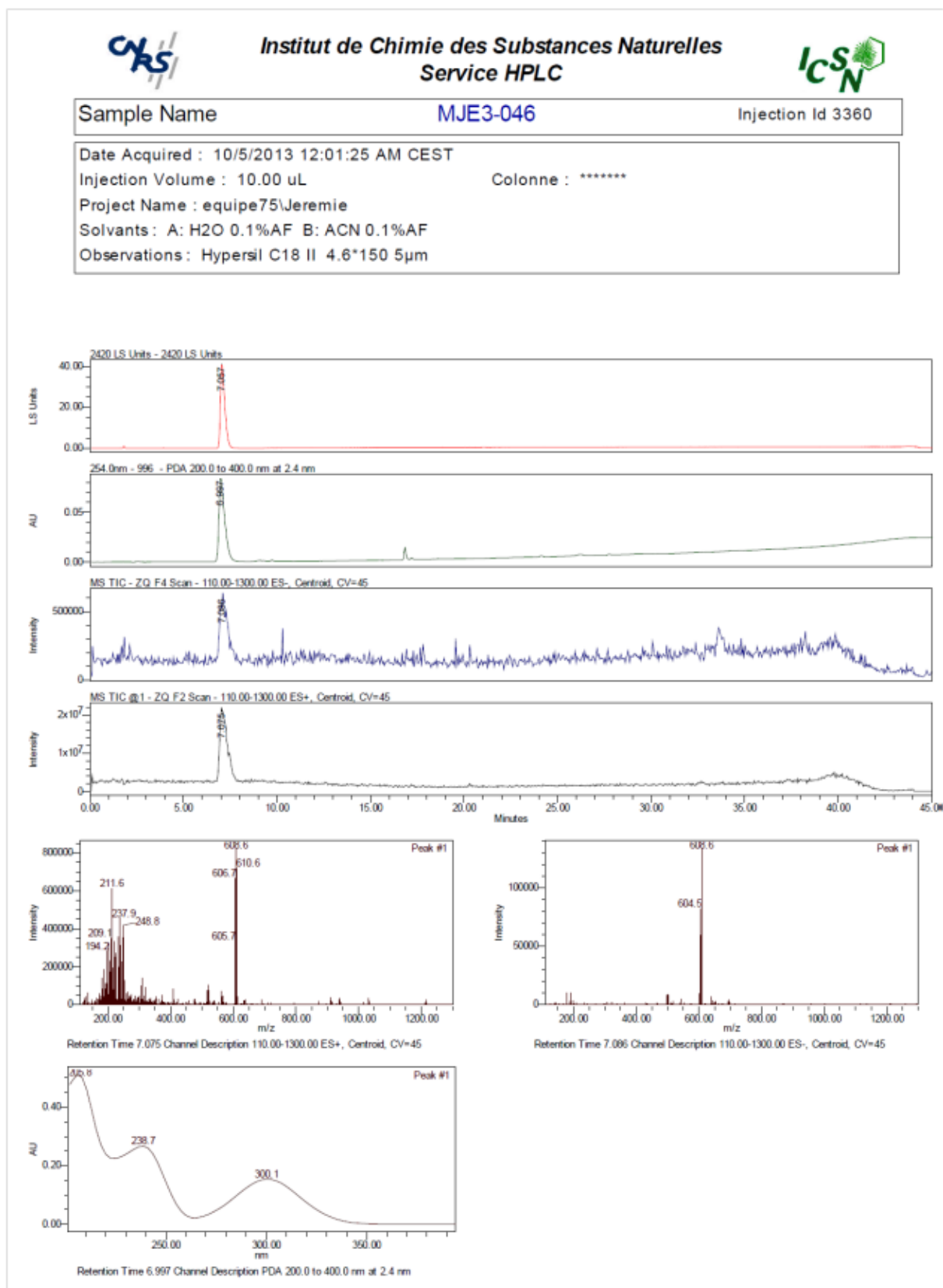


HPLC/MS and UV spectra of **Eu(DO3A-Py-NH₂(5))** :



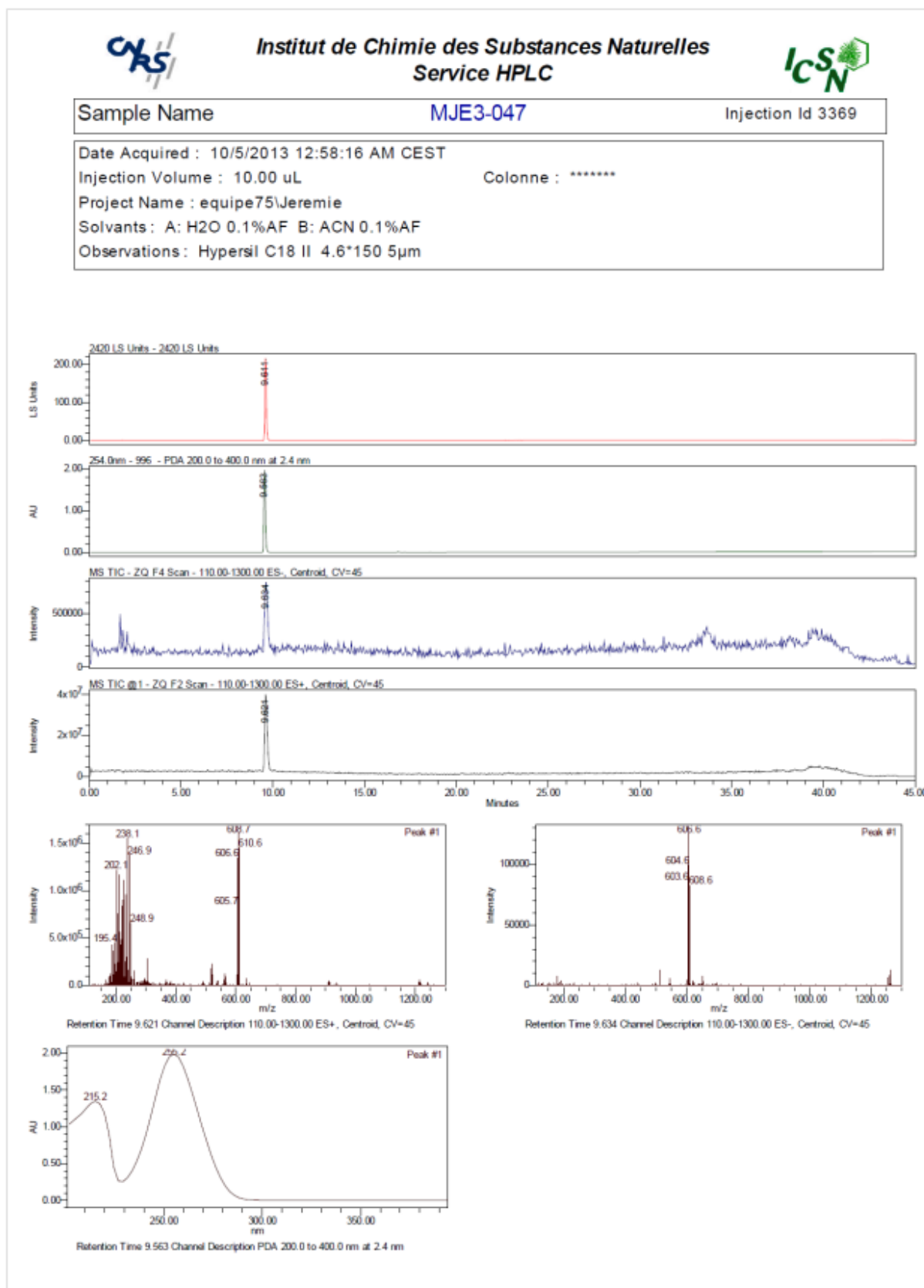
Annexes

HPLC/MS and UV spectra of **Gd(DO3A-Py-NH₂(3))** :



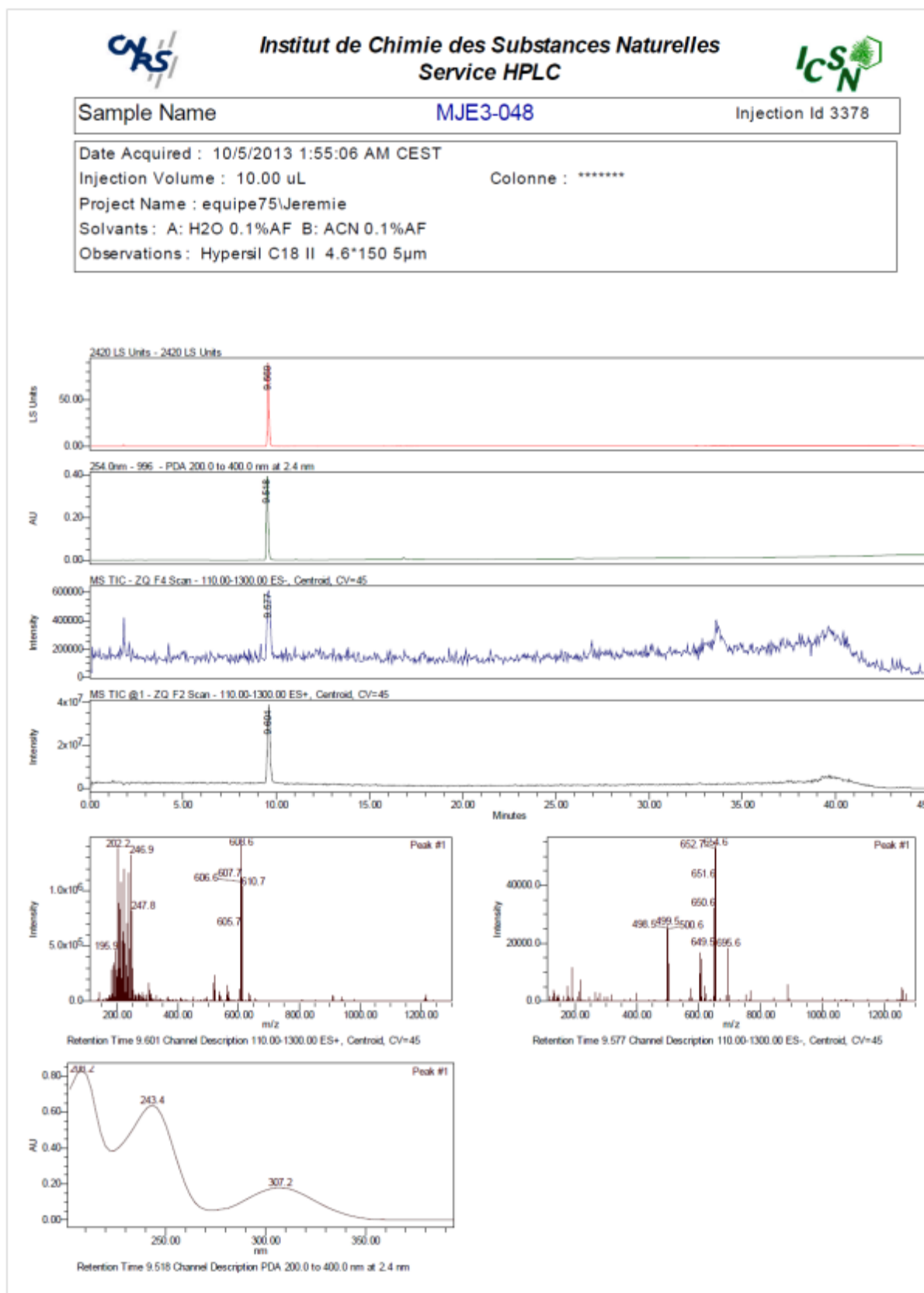
Annexes

HPLC/MS and UV spectra of **Gd(DO3A-Py-NH₂(4))** :



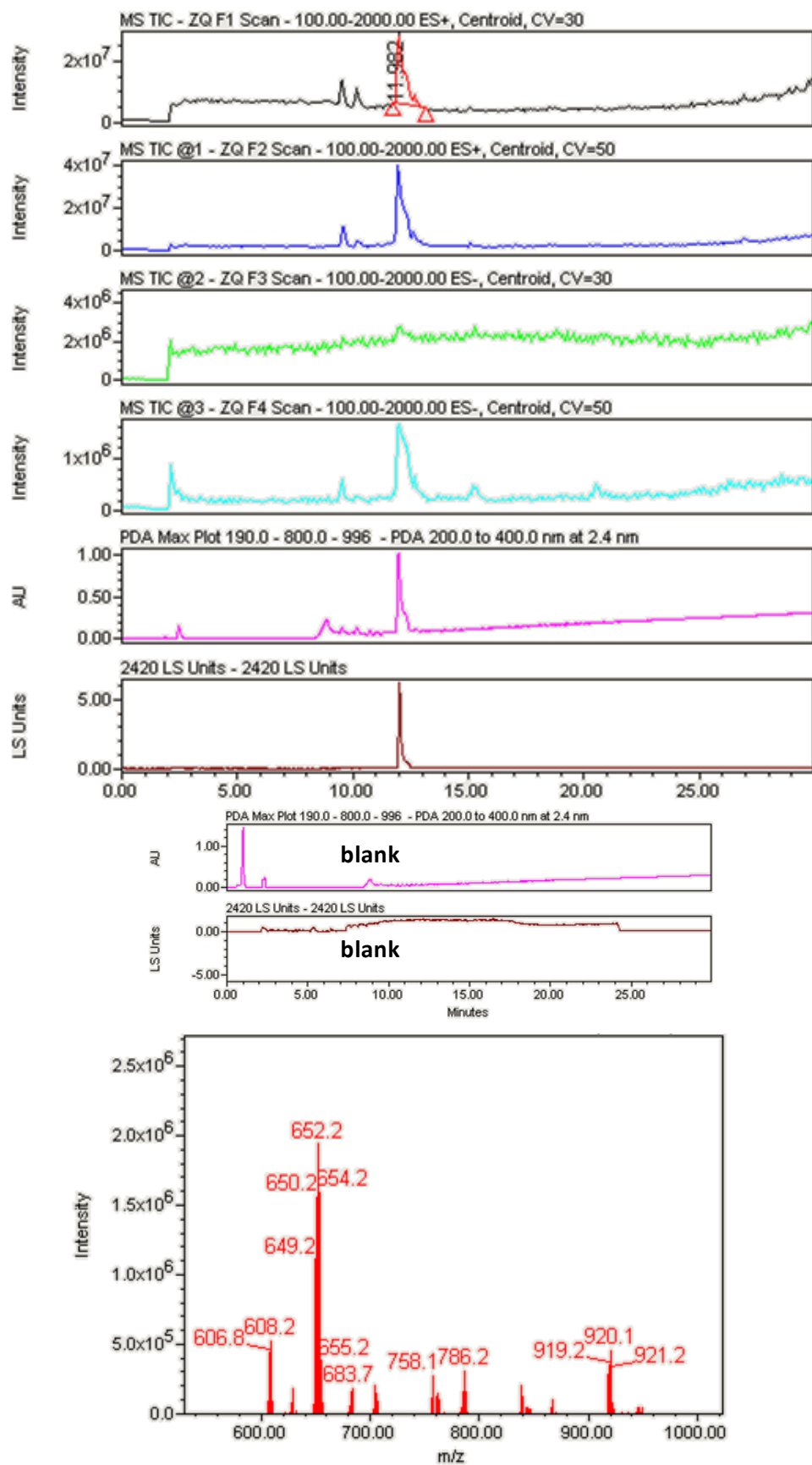
Annexes

HPLC/MS and UV spectra of **Gd(DO3A-Py-NH₂(5))** :



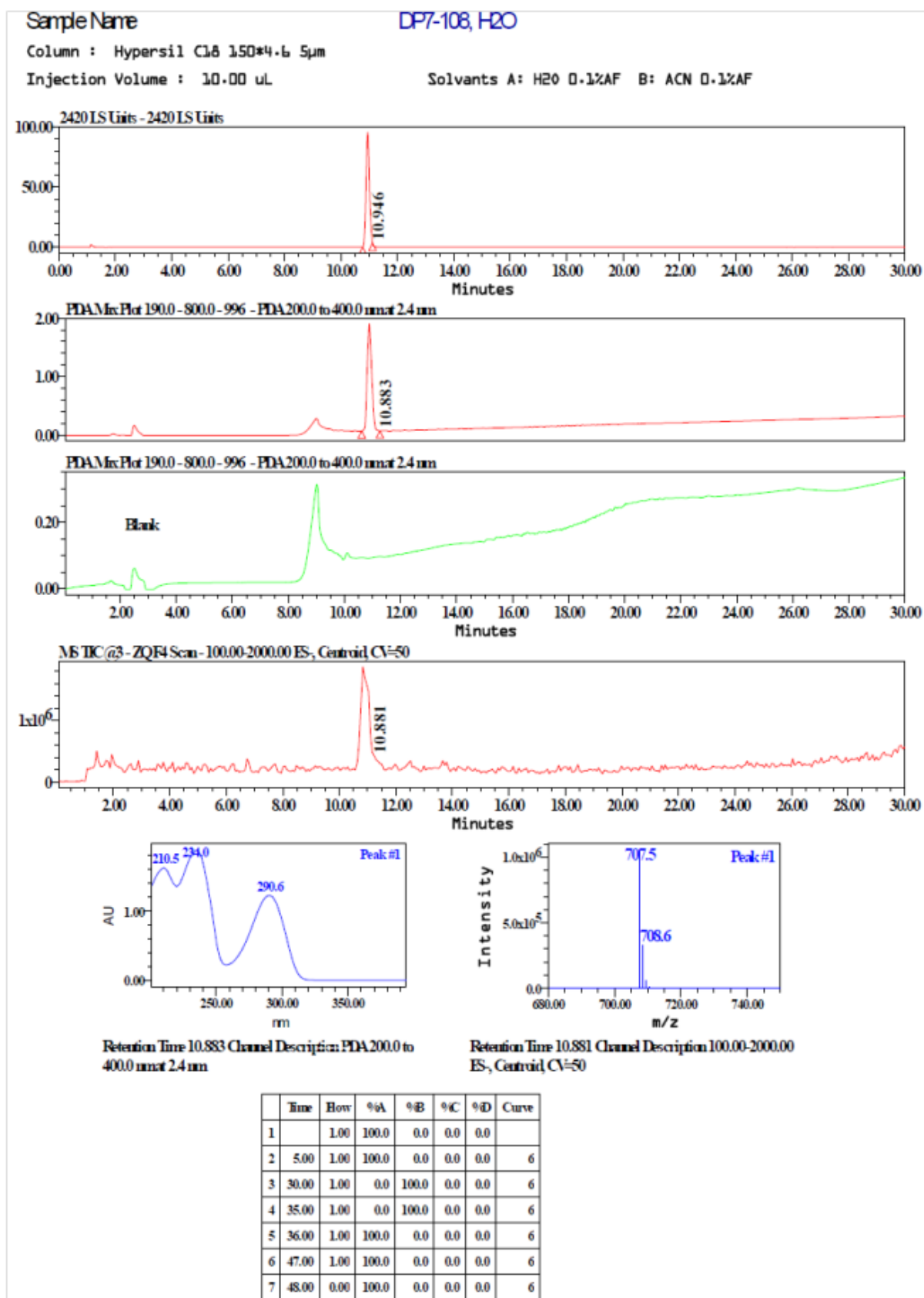
Annexes

HPLC/MS spectra of **Gd(DO3A-Py-Gal(5))** :



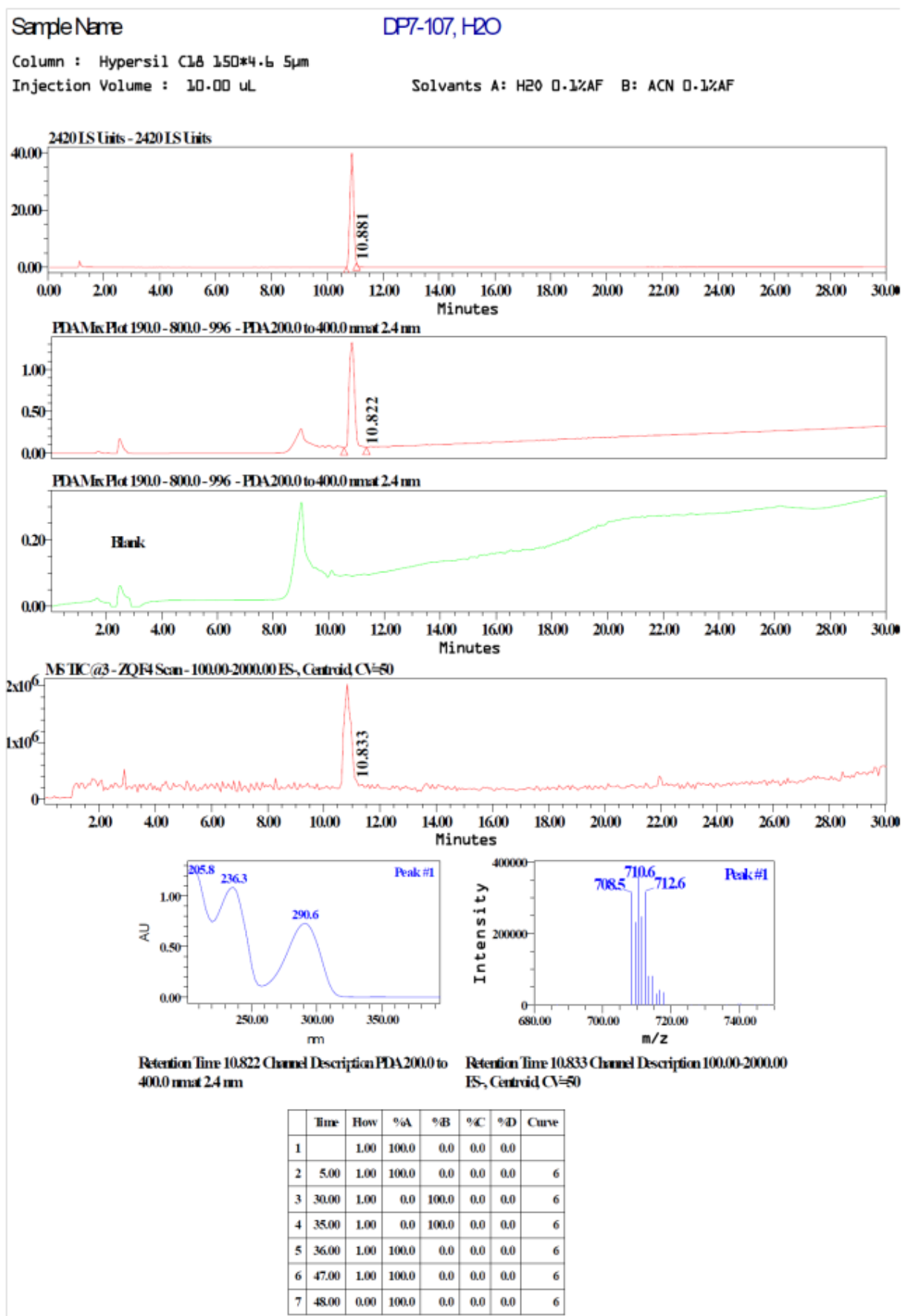
8.3. LC/MS spectra of complexes from Chapter 4

HPLC/MS and UV spectra of **Pr(DO3A-Py-Am(6))** :



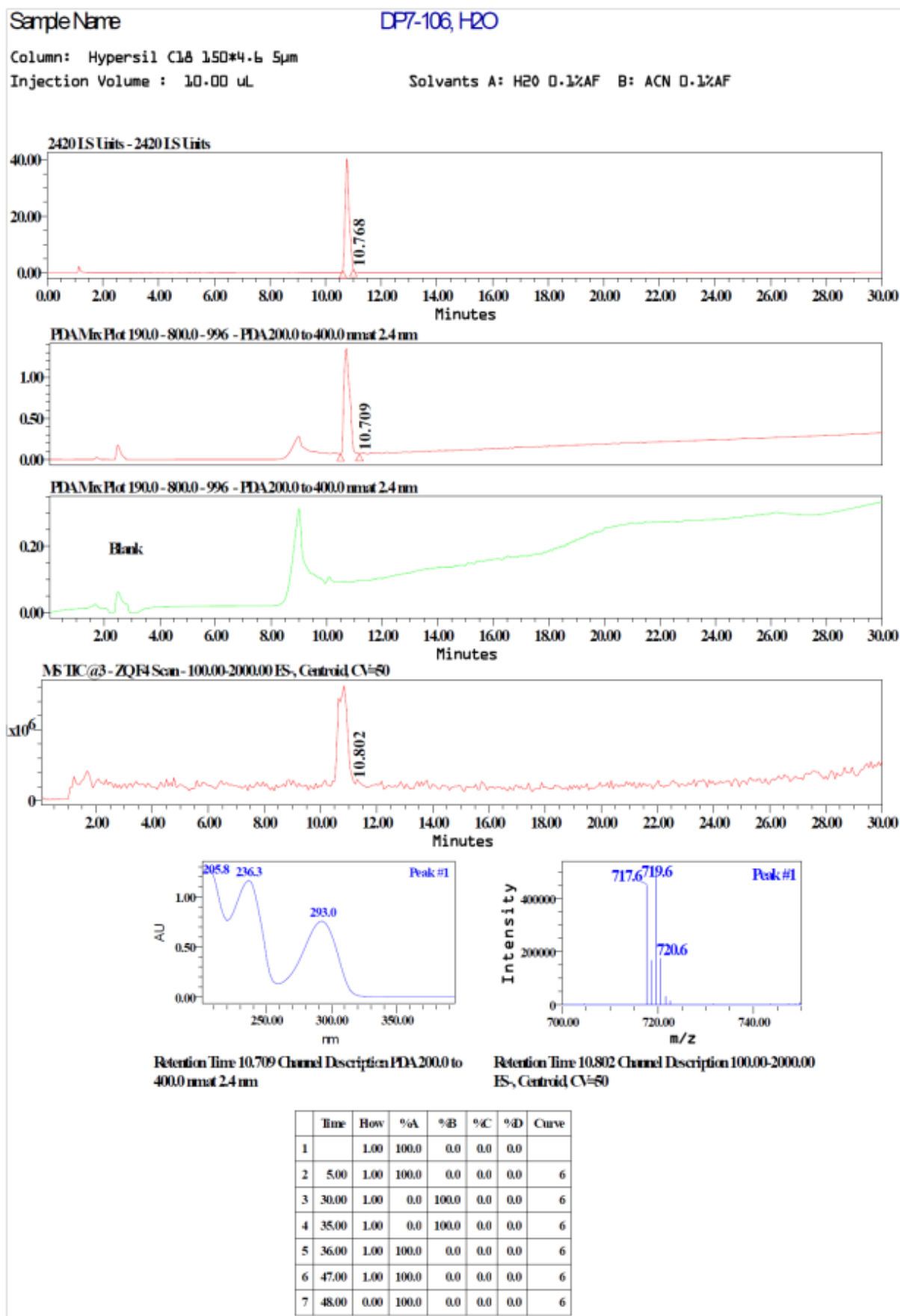
Annexes

HPLC/MS and UV spectra of Nd(DO3A-Py-Am(6)) :



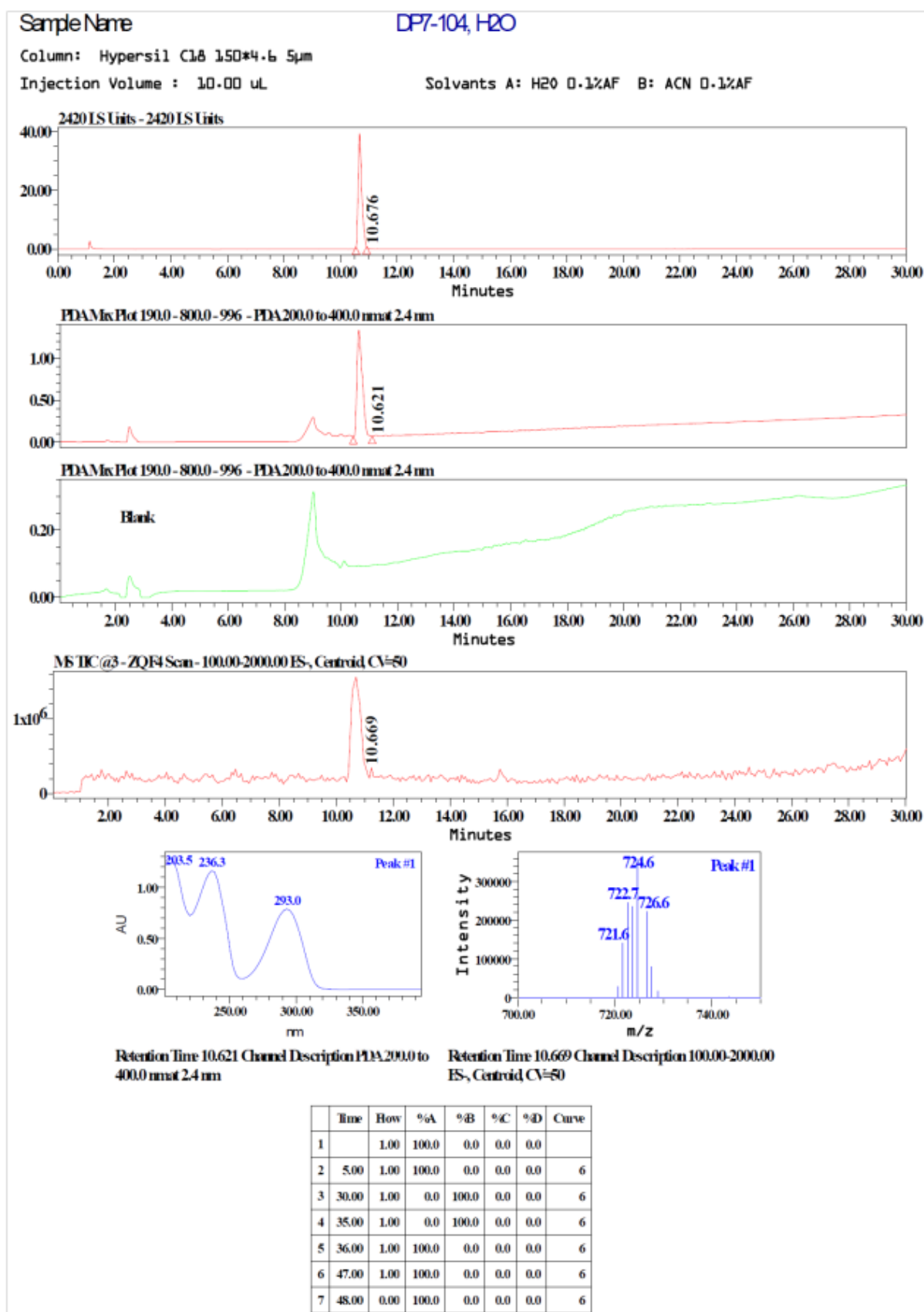
Annexes

HPLC/MS and UV spectra of **Eu(DO3A-Py-Am(6))** :



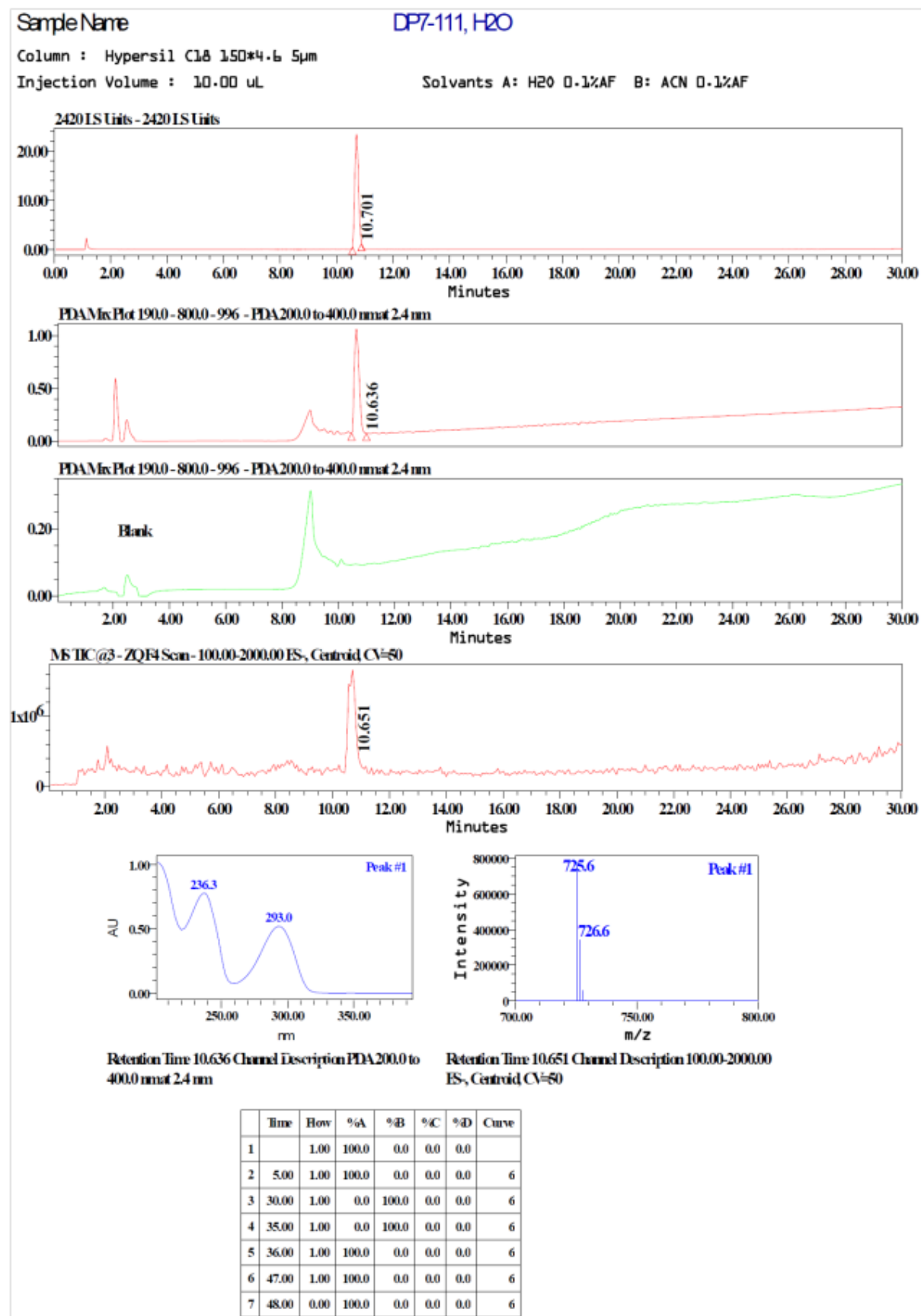
Annexes

HPLC/MS and UV spectra of **Gd(DO3A-Py-Am(6))** :



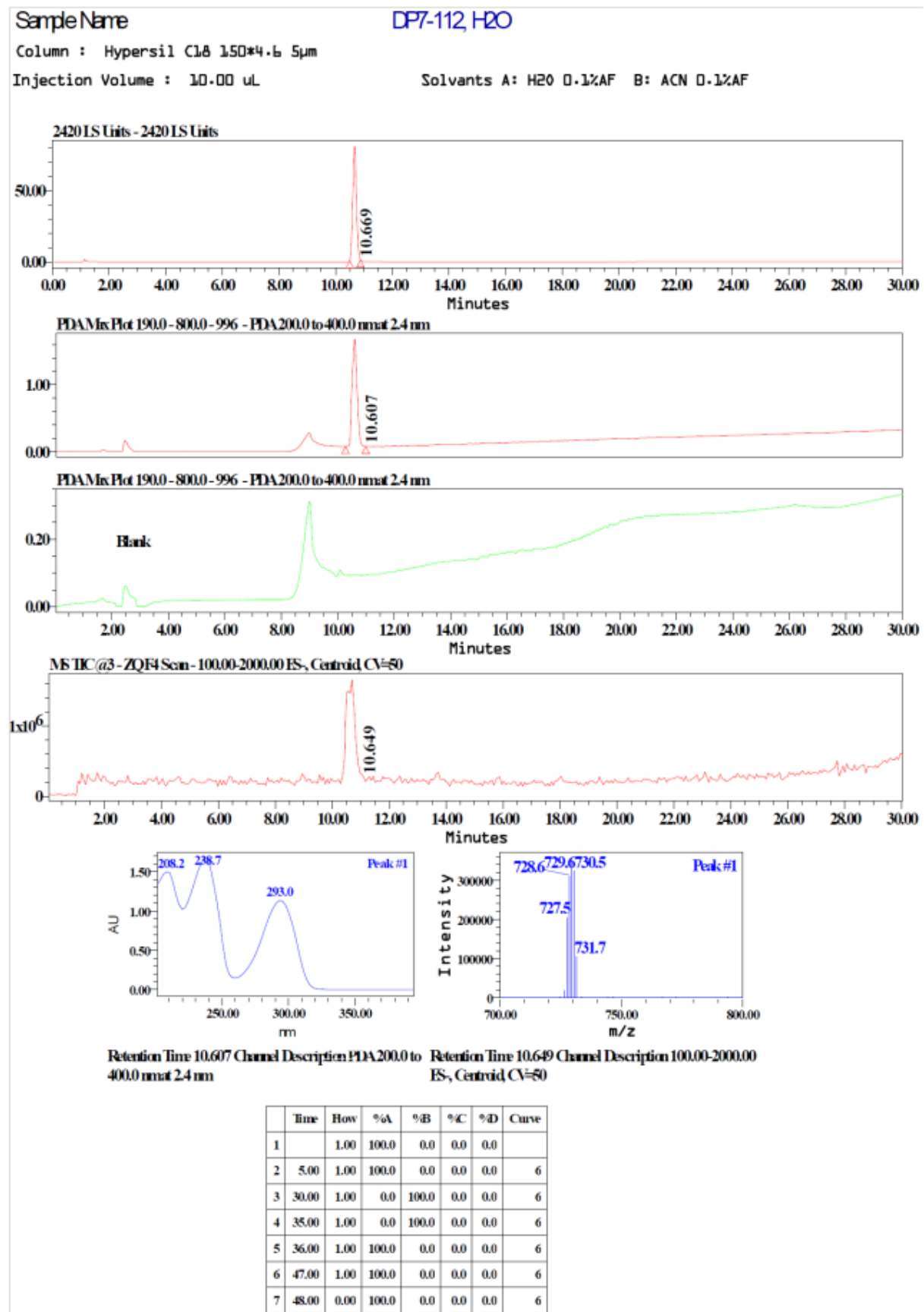
Annexes

HPLC/MS and UV spectra of **Tb(DO3A-Py-Am(6))** :



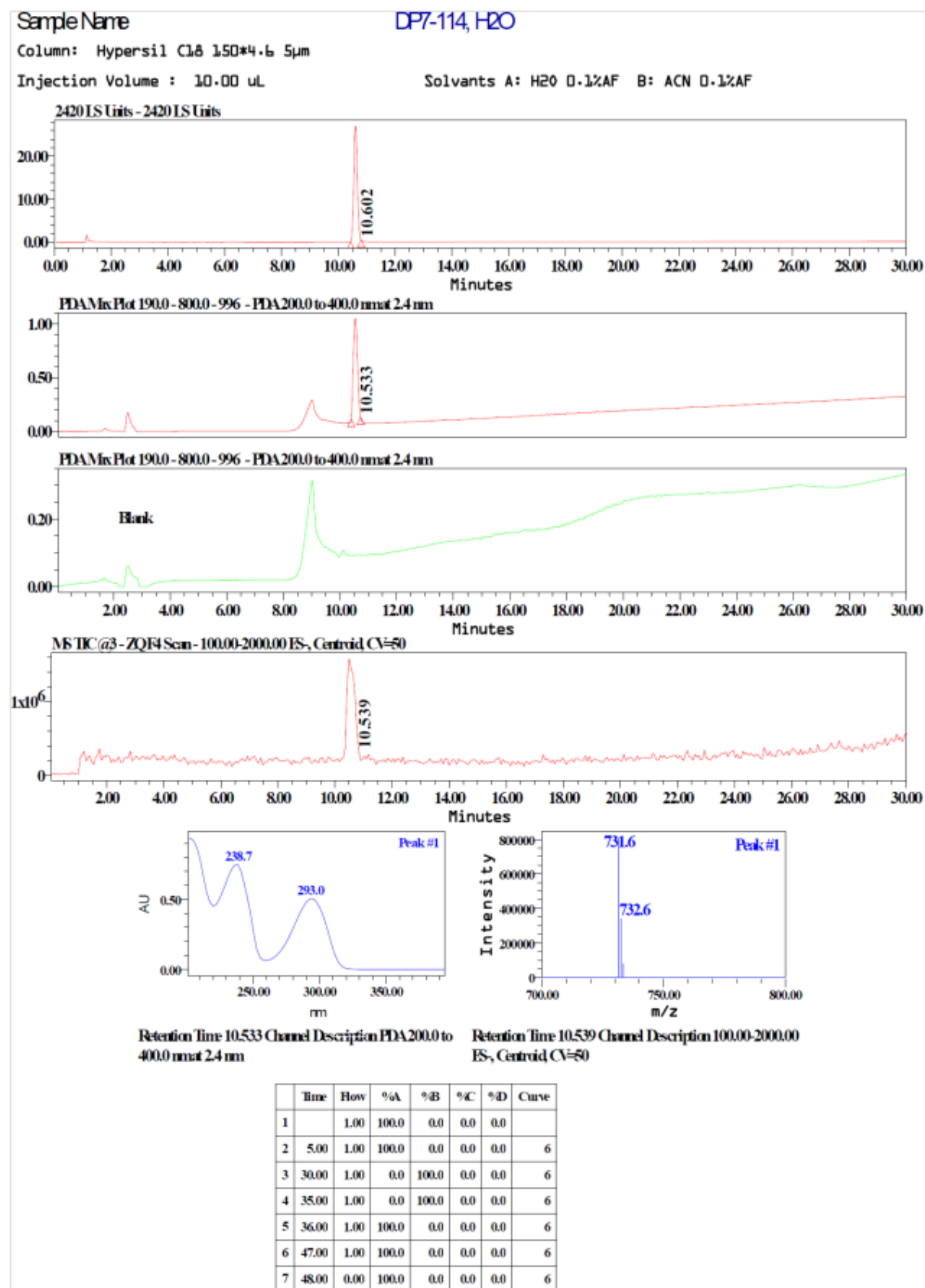
Annexes

HPLC/MS and UV spectra of **Dy(DO3A-Py-Am(6))** :



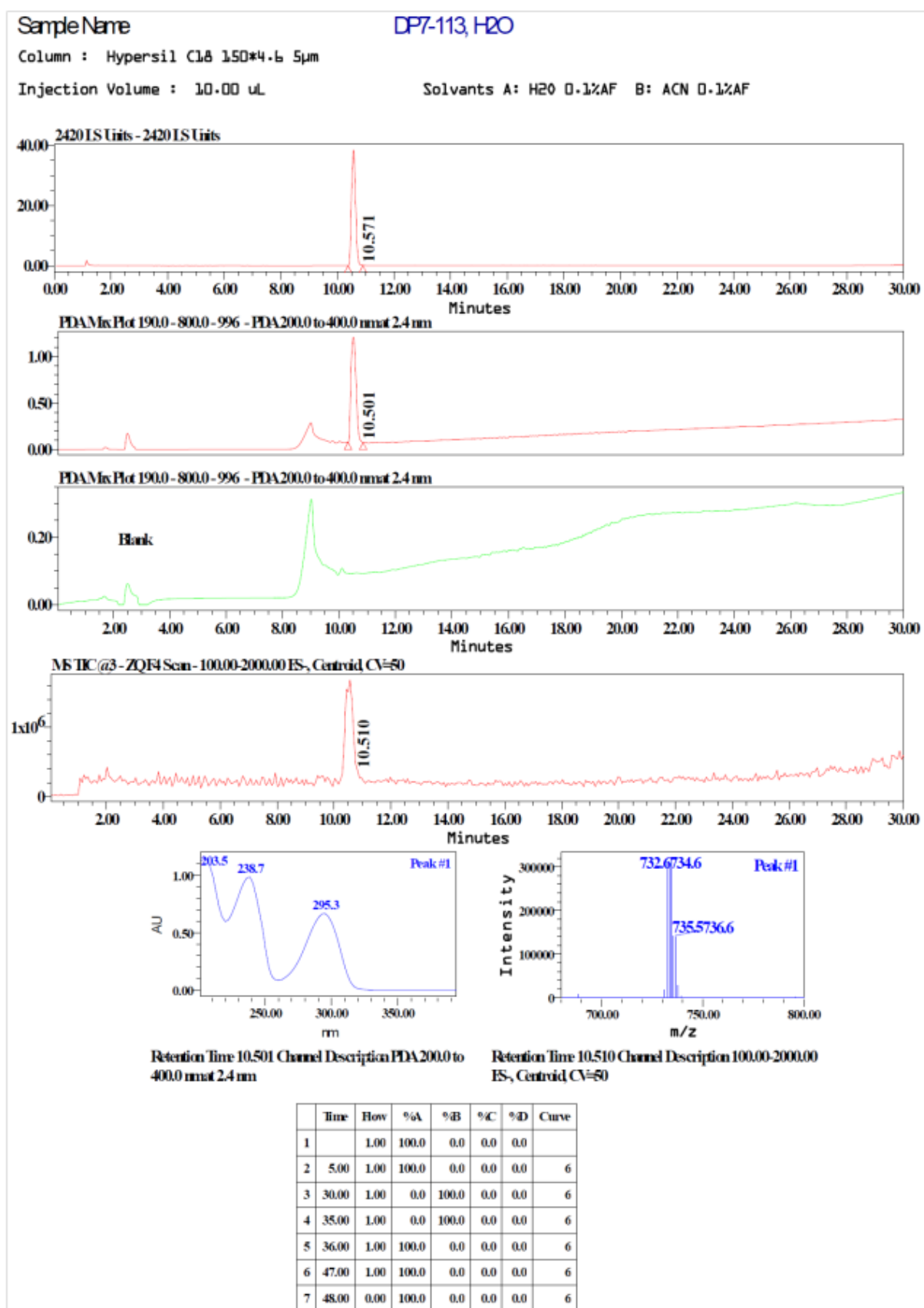
Annexes

HPLC/MS and UV spectra of **Ho(DO3A-Py-Am(6))** :



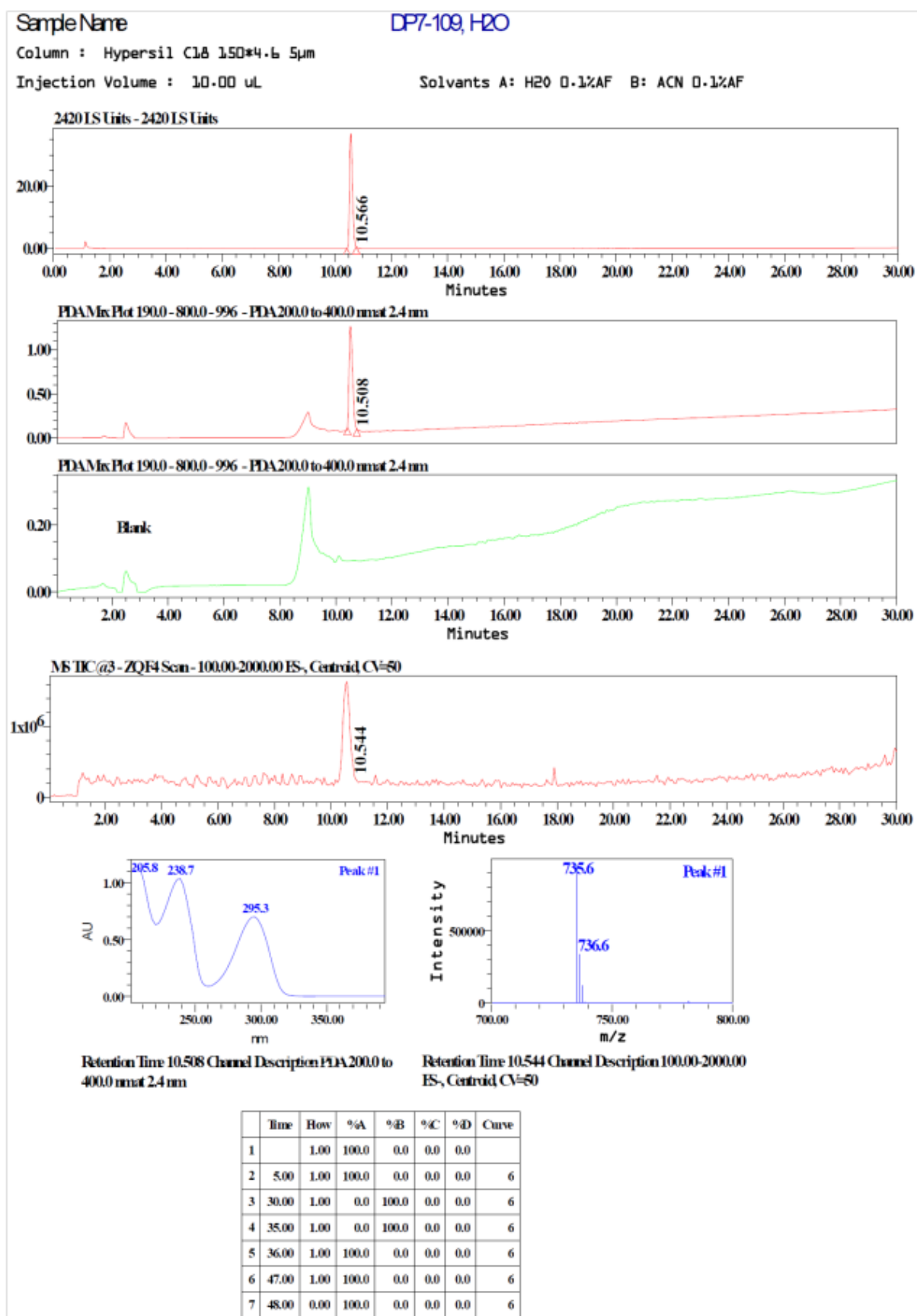
Annexes

HPLC/MS and UV spectra of Er(DO3A-Py-Am(6)) :



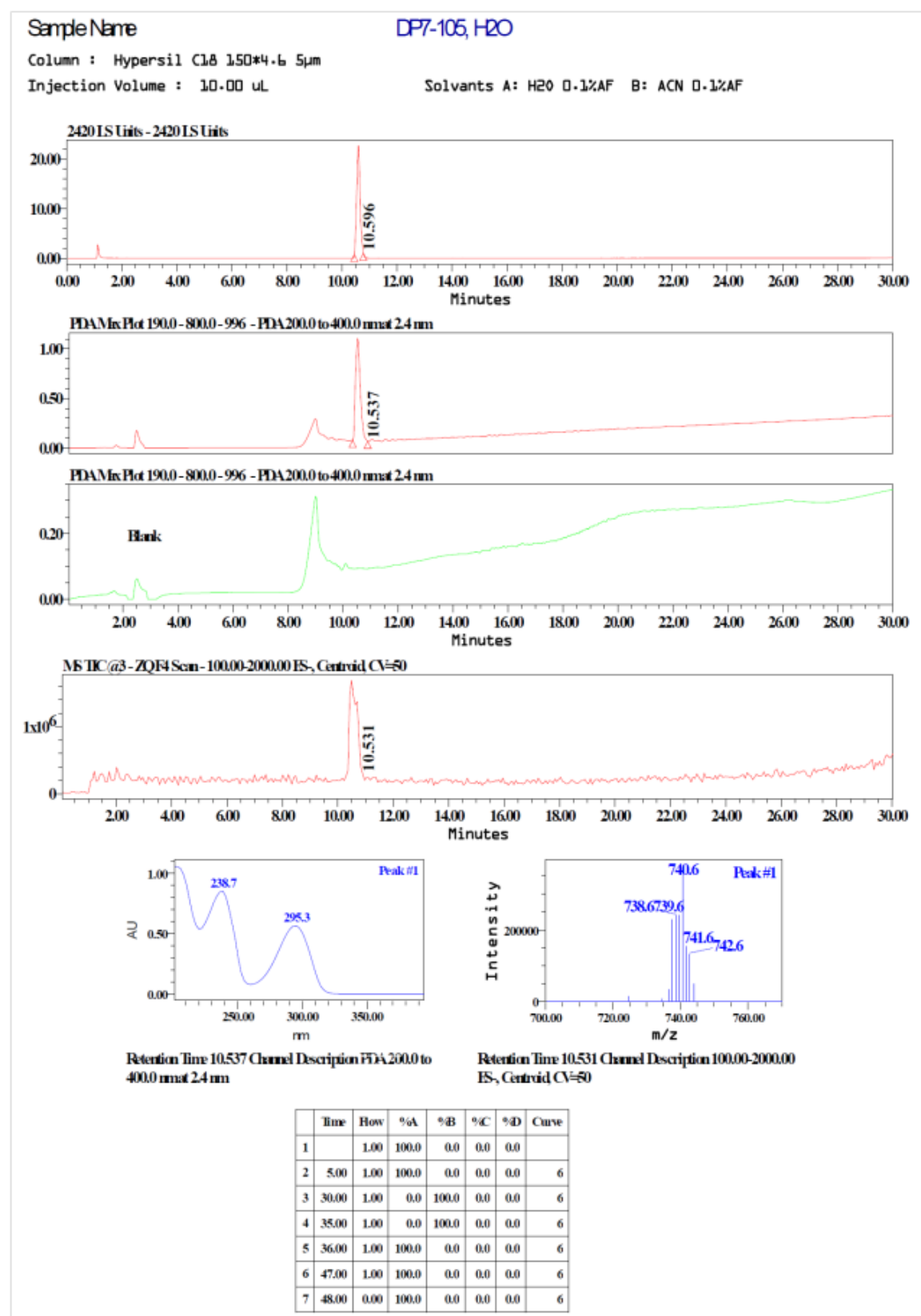
Annexes

HPLC/MS and UV spectra of Tm(DO3A-Py-Am(6)) :



Annexes

HPLC/MS and UV spectra of **Yb(DO3A-Py-Am(6))** :



Sophie LAINE

Complexes de lanthanide pour la détection d'activité enzymatique par IRM

Résumé :

L'imagerie par résonance magnétique trouve depuis ces dernières années des applications notables dans le domaine de l'imagerie moléculaire, qui représente un atout considérable pour l'investigation et la compréhension des processus biologiques. Des agents de contraste dits « intelligents » et spécifiques du processus physiologique que l'on souhaite détecter (pH, température, concentration en ion métallique, métabolite, etc.) sont alors développés.

Cette thèse se concentre sur le développement et l'étude de nouveaux agents de contraste conçus pour la détection spécifique de l'activité enzymatique. Ces agents consistent en un complexe de lanthanide paramagnétique de type LnDO3A couplés par le biais d'un espaceur (auto-immolable par exemple) au substrat spécifique de l'enzyme ciblée. Après coupure du substrat par l'enzyme, la structure chimique de l'agent de contraste est modifiée entraînant des variations significatives de la relaxivité et des propriétés paraCEST des complexes.

La caractérisation physico-chimique de certains complexes de Ln³⁺ et de Mn²⁺ a été réalisée. Les complexes de Gd³⁺ étudiés ont eu des réponses enzymatiques T₁ prometteuses et les complexes de Ln³⁺ paramagnétiques étudiés (autres que Gd³⁺) ont montré une possible détection paraCEST de l'activité enzymatique. Les paramètres influençant l'effet CEST (structure moléculaire du complexe, choix du lanthanide, etc.) ont également été mis en évidence. Cependant la coupure enzymatique de certains composés reste encore à améliorer.

Mots clés : IRM, agents de contraste, relaxivité, paraCEST, détection enzymatique, lanthanides, stabilité thermodynamique, inertie cinétique.

Lanthanide complexes to detect enzymatic activity by MRI

Summary:

Over the past years, Magnetic Resonance Imaging has found significant applications in the field of molecular imaging, which is a considerable asset for investigating and understanding biological processes. Towards this objective, smart or responsive contrast agents (CA) which are specific of the physiological phenomenon that we aim to visualize (pH, temperature, metal ion concentration, metabolites, etc.) have been widely explored.

This thesis focuses on the synthesis and the investigation of novel CAs designed for specific detection of enzyme activities. These CAs consist of a DO3A-type lanthanide chelate coupled *via* a spacer (e.g. a self-immolative linker) to an enzyme-specific substrate. After cleavage of the substrate by the enzyme, the CA's chemical structure is modified leading to significant variations in the relaxivity or the paraCEST properties of the complexes.

In this context, the physical chemical characterization of several Ln³⁺ and Mn²⁺ complexes has been achieved. Some Gd³⁺ complexes showed promising T₁ responses while other paramagnetic Ln³⁺ complexes (Ln³⁺ = other than Gd³⁺) exhibited interesting paraCEST properties for enzymatic detection. The parameters affecting CEST properties (e.g. molecular structure of the complex, choice of lanthanide, etc.) have also been widely investigated. Nevertheless, the enzymatic cleavage of some compounds still need to be improved.

Keywords: MRI, contrast agents, relaxivity, paraCEST, enzymatic detection, lanthanides, thermodynamic stability, kinetic inertness



Centre de Biophysique Moléculaire
Rue Charles Sadron
45071 ORLEANS Cedex 2

