

UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

*ÉCOLE DOCTORALE SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE
DU VIVANT*

Centre Biophysique Moléculaire (CBM), UPR4301, CNRS, Orléans

THÈSE présentée par :

Daouda NDIAYE

soutenue le : 29 Novembre 2021

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

Discipline : Chimie

**Complexes de manganèse (II) par des ligands de
type bispidine pour des applications en imagerie
médicale (IRM, TEP)**

THÈSE dirigée par :

Dr. Eva JAKAB TOTH Directrice de Recherche, CNRS, Orléans

Co-encadrante :

Dr. Sara LACERDA Chargée de Recherche, CNRS, Orléans

RAPPORTEURS :

Dr. Pascale DELANGLE Chercheuse, CEA, Grenoble

Dr. Michel MEYER Chargé de Recherche HDR, Université Bourgogne, Dijon

JURY :

Dr. Pascale DELANGLE Chercheuse, CEA, Grenoble

Dr. Michel MEYER Chargé de Recherche, Université Bourgogne, Dijon

Pr. Franck SUZENET Professeur, Université d'Orléans, Orléans (**Président jury**)

Dr. Katalin SELMECZI Maître de Conférences, Université de Lorraine, Nancy

Dr. Eva JAKAB TOTH Directrice de Recherche, CNRS, Orléans

Dr. Sara LACERDA Chargée de Recherche, CNRS, Orléans

Dédicace

Ce manuscrit de thèse doctorale est dédié à mes deux parents, plus particulièrement à mon défunt père, mon professeur, mon idole, mon conseiller, le Pr. Ibrahima NDIAYE, affectivement appelé « Ndiaye chimie organique » par ses ex étudiants, qui m'a contaminé « le virus de la chimie » dès le bas âge.

Déjà en cycle primaire, quand je te voyais corriger les copies d'examens de tes étudiants, je me disais à chaque fois, c'est quoi ces dessins 😊 « les structures moléculaires » et voilà quelques années plus tard, le destin m'a mené à passer une bonne partie de mes journées à faire des études structurales de molécules.

Les deux années et demi que tu m'as tenu compagnie à travers les échanges téléphoniques durant les week-ends m'ont été très utiles sur l'organisation de mes quotidiens pour que je puisse avancer sur mes travaux de thèse. J'aurais bien aimé que tu sois là le jour de ma soutenance comme je l'étais à ta soutenance de thèse d'état, il y a de cela 26 ans, d'ailleurs j'en garde une belle photo de souvenir, mais le bon dieu l'a décidé ainsi, je l'accepte et je te dis « rest in peace ».

Sache que je ferai tout mon possible pour atteindre le stade que tu m'as toujours souhaité, j'en suis bien conscient que je suis au tout début et qu'il reste beaucoup de défis à surmonter, mais tes conseils qui résonnent toujours dans mes oreilles me tiendront compagnie.

Remerciements

Après avoir rendu grâce à dieu qui m'a donné la santé et la force de tenir debout pendant des moments pas évidents pour que je puisse arriver à cette étape de mes objectifs.

Je remercie l'équipe « Complexes métalliques et IRM », du Centre Biophysique Moléculaire (CBM), CNRS et l'Université d'Orléans pour avoir financé mon projet de thèse doctorale.

Un grand merci aux membres du jury, Dr. Michel MEYER, Dr. Pascale DELANGLE, Pr. Franck SUZENET et Dr. Katalin SELMECZI, d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je tiens à adresser un chaleureux remerciement à ma directrice de thèse le Dr. Eva JAKAB TOTH de m'avoir fait confiance et donné l'opportunité de réaliser cette thèse ; « köszönöm ». Pendant les trois années, grâce à ton expertise scientifique, j'ai beaucoup appris à tes côtés sur tous les plans, et tu as été toujours disponible malgré tes lourdes tâches administratives. Ton enthousiasme, ta rigueur, ton esprit d'équipe, ta bienveillance, tes conseils m'ont permis de mener à bien ces travaux de thèse, je t'en serai toujours reconnaissant et comme on dit chez nous au Sénégal « *Dieuredieuf* ».

Un immense merci à ma co-encadrante, le Dr. Sara LACERDA, toujours disponible et bienveillante. Grâce à toi, j'ai découvert l'univers de la radiochimie à travers les expériences de radiomarquage avec le ^{52}Mn , et c'était émouvant avec tout le dispositif de radioprotection, etc.

Un grand merci à Agnès PALLIER qui m'a beaucoup aidé en m'apportant son expertise sur l'utilisation des différents appareils de mesure. Je remercie aussi le Dr. Célia BONNET pour m'avoir initié au fit par le biais d'Hyperquad pour la détermination des constantes de stabilité thermodynamique, le Dr. Sandra MEME pour les manipulations en IRM, le Dr. Jean-François MORFIN pour les conseils en synthèse organique, et tout l'ensemble du groupe. Merci à Hervé MEUDAL de la plateforme RMN pour les astuces que tu m'as rapportées lors des études RMN. Je remercie également Isidro da Silva du CEMHTI pour la production du ^{52}Mn . En résumé, je peux dire que j'étais entre de bonnes mains, et encore une fois merci à l'ensemble du CBM, « *Dieuredieuf* ».

Je remercie le Dr. Loïc Charbonnière et le Dr. Aline Nonat, ainsi que Maryame Sy, de l'IPHC à Strasbourg, pour la synthèse de la première famille des ligands.

Merci également au Prof. Peter Comba et au Dr. Patrick Cieslik, de l'Université de Heidelberg, pour nous avoir fourni les ligands de la deuxième famille.

Je remercie tous les membres de ma famille, mes frères, mes sœurs, ma chère brave mère, toujours présente pour nous épauler, sans oublier mon défunt père, grâce à qui j'en suis arrivé là, et comme tu me disais « chaque jour, fais comme si tu venais de découvrir la chimie, et qu'il te reste beaucoup de choses à apprendre ».

Un grand merci aussi à ma chère femme pour ta compréhension par rapport à tous ces week-ends où je restais au labo sans venir te voir sur Paris 😊.

Abréviations

AAZTA	6-amino-6-méthylperhydro-1,4-diazépine tétraacétique
AAZ3A	1,4-bis(carboxyméthyl)-6-(carboxyméthyl)amino-6-méthylperhydro-1,4-diazépine
AAZ3MA	1,4-bis((1R)-carboxyéthyl)-6-((1R)-carboxyéthyl)amino-6-méthylperhydro-1,4-diazépine
AC	Agent de contraste
9-aneN₂O-2A	1-oxa-4,7-diazacyclononane-4,7-diacétique
9-aneN₂O-2P	1-oxa-4,7-diazacyclononane-4,7-bis(méthylènephosphonique)
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BMS	Bulk magnetic susceptibility
Boc	Butoxycarbonyl
CCM	Chromatographie sur couche mince
CDTA	1,2-Cyclohexanediamine-N,N,N',N'-tétraacétique
DFT	Density Functional Theory
DMP	Diméthylpipérazine
Dpama	6,6'-((méthylazanediyl)bis(méthylène))dipicolinique
DOTA	Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique
DO1A	2-(1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1-yl)acétique
1,4-DO2A	2,2'-(1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4-diyl)-diacétique
1,7-DO2A	2,2'-(1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,7-diyl)-diacétique
DO3A	Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7-triacétique
DPA	Dipicolylamine
DPDP	N,N'-dipyridoxyéthylènediamine-N,N'-diacétate-5,5'-bis-(phosphate)
Dpy	Dipyridyle
DTPA	Acide diéthylène triamine pentaacétique
EB	Evan's Bleu
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EG	Echo gradient
EOB	Ethoxybenzyl
ES	Echo spin
FDA	Food and Drug Administration
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HPLC	High performance liquid chromatography
HSA	Albumine sérique humaine (Human serum albumin)
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma-Optical Emission spectroscopy
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IS	Sphère Interne
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry

MeAAZ3A	1,4-Bis(carboxymethyl)-6-(methyl)(carboxymethyl)amino-6-methylperhydro-1,4-diazepine
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
NMP	N-méthylpipérazine
NMRD	Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion
Nompa	6-((1,4,7-Triazacyclononan-1-yl)methyl)picolinic acid
NOTA	2,2',2''-(1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triyl)triacetic acid
NO2A	1,4,7-triazacyclononane-1,4-diacetic acid
OBn	benzoyl group
ODO3A	Acide 1,4,7-triaza-10-oxo-cyclododécane-1,4,7-triacétique
OS	Outer Sphere
Pa	Picolinic acid
PCTA	3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-triene-3,6,9-triacetic acid
PC1A	6-carboxymethyl-3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1] penta-deca-1(15),11,13-triene
PC1P	6-dihydroxy-phosphorylmethyl-3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-triene
PC2A-EA	3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-triene-3, 9-diacetic acid-ethylamine
Py	Pyridine
PyC3A	N-picolyl-N,N',N'-trans-1,2-cyclohexylenediaminetriacetate
15-pyN₅	3,6,9,12,18-pentaazabicyclo[12.3.1]octadeca-1(18),14,16-triene
15-pyN₃O₂	3,12,18-Triaaza-6,9-dioxabicyclo[12.3.1]octadeca-1(18),14,16-triene
R₁ / R₂	Vitesse de relaxation longitudinale / transversale
r₁ / r₂	Relaxivité longitudinale / transversale
RF	Radio fréquence
RGD	Tripeptide constitué d'arginine-glycine- et d'acide aspartique
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROESY	Rotating frame Overhauser Effect spectroscopy
SBM	Solomon-Bloembergen-Morgan
SOD	Superoxyde dismutase
T₁ / T₂	Temps de relaxation longitudinal / transversal
T.A	Température ambiante
TR	Temps de répétition
TEP	Tomographie par émission de positron
TOCSY	Total correlation spectroscopy
UV	Ultra-Violet

Sommaire

Chapitre 1 : Introduction générale	1
Contexte	2
1. Le Manganèse	5
1.1. Généralités	5
1.2. Propriétés chimiques.....	6
1.3. Propriétés magnétiques.....	8
2. Généralités sur les agents de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ...	9
2.1. Principe de fonctionnement de l'IRM	10
2.2. Les agents de contraste de type T_1 , T_2	14
2.3. Mécanisme d'action des complexes de Mn^{2+} sur la relaxation des spins nucléaires des hydrogènes de l'eau	17
2.4. Paramètres influençant sur la contribution de la sphère interne sur la relaxivité	20
3. Généralités sur les sondes pour la tomographie par émission de	25
positons (TEP).....	25
4. Propriétés physico-chimiques des complexes de manganèse pour l'imagerie résonance magnétique (IRM)	31
4.1. Complexes de Mn^{2+} basés sur des ligands linéaires	31
4.1.1. Dérivés de l'EDTA	31
4.1.2. Ligands linéaires rigides	34
4.1.3. Dérivés picolinate.....	35
4.2. Complexes de Mn^{2+} basés sur des macrocycles	36
4.2.1. Macrocycles à 9 chaînons	36
4.2.2. Macrocycles à 12 chaînons	37
4.2.3. Macrocycles plus grands.....	39
4.3. Complexes de Mn^{2+} basés sur d'autres types de ligands.....	40
4.4. Inertie cinétique et stabilité thermodynamique	40
4.5. Complexes de Mn^{2+} responsifs.....	43
4.5.1. Sondes sensibles à l'état redox basées sur le couple Mn^{3+}/Mn^{2+}	45
4.5.2. Sondes responsives au pH.....	46

4.5.3. Sondes responsives à d'autres biomarqueurs.....	47
4.6. IRM responsive basée sur le relargage du Mn^{2+}	47
5. Les Bispidines	49
5.1. Généralités	49
5.1.1. Synthèse	50
5.1.2. Stéréochimie	52
5.2. Applications des bispidines et de leurs complexes.....	55
6. Objectifs de la thèse	59
Références	61

Chapitre 2 : Caractérisation du complexe $Mn(L^1)$ hautement inerte 72

1. Synthèse	74
1.1. Synthèse du ligand L^1	74
1.2. Etude RMN du ligand L^1	75
1.3. Formation du complexe $[Mn(L^1)]^-$	80
2. Stabilité du complexe $[Mn(L^1)]$	82
2.1. Constantes de protonation de L^1	82
2.2. Constantes de stabilité des complexes $[M(L^1)]$	86
3. Inertie du complexe $[Mn(HL^1)]$	90
3.1. Etude de l'inertie de $[Mn(HL^1)]$ entre pH 3,1 et 6,0 en présence de zinc (Zn^{2+})	90
3.2. Etude de l'inertie de $[Mn(HL^1)]$ à pH très acide en absence de Zn^{2+}	93
4. Propriétés de relaxation du complexe $[Mn(HL^1)]$	95
5. Etude RMN du complexe $[Mn(HL^1)]$	102
5.1. Etude RMN à pH 7	103
5.2. Etude RMN à pH 5	108
6. Etude de biodistribution et pharmacocinétique du complexe $[Mn(HL^1)]$	115
6.1. Etude <i>in vivo</i> (IRM) : Pharmacocinétique	115
6.2. Etude <i>ex vivo</i> (ICP-OES) : Biodistribution.....	116
7. Radiomarquage du ligand L^1 par le $^{52}Mn^{2+}$	117
7.1. Radiomarquage et étude de stabilité.....	118
7.1.1. Radiomarquage du ligand L^1	118
7.1.2. Etude de stabilité.....	121

7.2. Etude <i>ex vivo</i> : [⁵² Mn(L ¹ -RGD)]	121
Conclusion.....	125
Référence.....	126

Chapitre 3 : Etude de la relation entre la structure et les propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)..... 130

Introduction	131
1. Synthèse et étude conformationnelle des bispidines	133
1.1. Synthèse des bispidines	133
1.1.1. Bispidines dérivées de la lysine	134
1.1.2. Bispidines dérivées du phosphonate	135
1.1.3. Bispidines dérivées de la glycine	136
1.2. Etude conformationnelle des ligands.....	137
1.2.1. Par pH-potentiométrie.....	137
1.2.2. Par étude RMN	140
2. Etude de la relation structures-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)	150
2.1. Etude de la complexation des ligands de type bispidine avec le Mn ²⁺ à pH physiologique et de la stabilité des complexes	150
2.1.1. Etude de la complexation à pH physiologique	150
2.1.2. Stabilité	157
2.2. Influence de la nature et de la position des groupements fonctionnels sur les propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine).....	164
2.2.1. Inertie des chélates de Mn(L).....	165
2.2.2. Influence de la nature et de la position des groupements fonctionnels sur les propriétés de relaxation des complexes Mn(L).....	181
Conclusions	190
Références	192

Chapitre 4 : Etude de ligands de type bispidine sélectifs au Mn²⁺ vs. le Zn²⁺ 196

Introduction	197
1. Synthèse, Complexation et stabilité thermodynamique des M(L)	199

1.1. Synthèse des ligands	199
1.2. Complexation.....	201
1.3. Stabilité des $[M(L^{9-11})]$	202
2. Inertie des $[Mn(L^{9-11})]$	214
2.1. Cinétique de dissociation en présence du Zn^{2+}	215
2.2. Cinétique de dissociation en présence du Cu^{2+}	225
3. Propriétés de relaxation	229
4. Etudes <i>in vivo</i> (IRM : Pharmacocinétique) et <i>ex vivo</i> (ICP-MS : Biodistribution).....	233
Conclusion.....	236
Références	238

Chapitre 5 : Conclusions générales et perspectives 242

Chapitre 6 : Partie expérimentale 250

1. Solvents and reagents	251
2. Solution preparation	251
3. Synthesis of the ligands.....	251
4. Potentiometric titrations	252
5. Relaxometric titrations	253
6. Dissociation kinetic studies.....	254
7. Relaxometric measurements	254
8. ^{17}O NMR studies	255
9. NMR studies.....	256
9.1. Study of the dissociation kinetics of the complex $[Mn(HL^1)]$	256
9.2. Conformational studies of the ligands L^{1-6}	256
9.3. NMR titration of L^{10} in the presence of Zn^{2+}	261
10. UV-visible spectroscopy	262
11. <i>In vivo</i> MRI studies	262
12. ICP-OES and ICP-MS measurements.....	263
12.1. ICP-OES	263
12.2. ICP-MS.....	264
13. $^{52}Mn^{2+}$ studies: Production, purification and radiolabelling	264

13.1. Production and purification of ^{52}Mn	264
13.2. Radiolabelling of L^1	265
13.3. <i>In vitro</i> stability of $[\text{}^{52}\text{Mn}(\text{HL}^1)]$	265
13.4. Lipophilicity	266
14. Biodistribution studies with $[\text{}^{52}\text{Mn}(\text{L}^1\text{-RGD})]$	266
References	268
Annexe	271
Annexe 1 : Analysis of ^{17}O NMR and NMRD data	272
Annexe 2 : ^{17}O transverse relaxivities of Mn^{2+} complexes as a function of the temperature.....	275
Annexe 3 : <i>In vivo</i> MRI studies.....	276
Annexe 4 : Dissociation kinetic studies	276
Annexe 5 : ^1H NMR spectrum of $\text{Zn}(\text{L}^{10})$, $\text{Zn}_2(\text{L}^{10})$: pH 6.5 and pH 8.5.....	278
References	279
CURRICULUM VITAE	281
Article de recherche	284

Chapitre 1 : Introduction générale

Introduction générale

Contexte

En imagerie médicale par résonance magnétique (IRM), dans 40 à 60 % des examens prescrits, l'usage d'un agent de contraste s'avère indispensable pour un diagnostic congruent. Cependant, lors de ces dernières décennies, les agents de contraste à base de gadolinium (Gd^{3+}) font l'objet d'une préoccupation de santé publique, du fait de leur toxicité liée au potentiel relargage du Gd^{3+} dans l'organisme. En effet, avec les complexes de Gd^{3+} basés sur des ligands linéaires, le relargage du métal dans l'organisme entraîne une compétition entre ce dernier et le Ca^{2+} , car ils ont un rayon ionique similaire. Le calcium intervient dans de nombreux processus biologiques dont la formation des os, des dents, la coagulation sanguine, la régulation du rythme cardiaque, ou le fonctionnement de nombreuses enzymes.

Suite à une injection d'agent de contraste à base de Gd^{3+} chez les patients souffrants d'une insuffisance rénale, on peut observer une fibrose systémique néphrogénique,¹ due aux effets profibrosants du gadolinium libre. On peut aussi observer des dépôts résiduels de gadolinium au niveau du cerveau.²

Face à cette situation, lors de ces dernières décennies, la recherche s'active pour trouver des alternatives au gadolinium, comme le manganèse. Ce dernier est un métal de transition essentiel dont l'isotope 55 (naturel) de degré d'oxydation 2+ (Mn^{2+} : $S = 5/2$) peut être utilisé pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM), et l'isotope 52 (radionucléide) pour la tomographie par émission de positrons (TEP). Les complexes de manganèse de degrés d'oxydation 3+ (Mn^{3+} : $S = 2$) basés par exemple sur des ligands porphyrines sont aussi étudiés en IRM. Le manganèse est le seul atome qui offre la possibilité de faire une imagerie bimodale (IRM / TEP), qui couple la haute sensibilité de la TEP et la très bonne résolution spatiale de l'IRM. Cela permet aussi de réaliser ces deux examens avec une seule injection et une biodistribution unique, d'où un gain de temps et une meilleure précision des résultats.

Le Mn^{2+} n'est pas nouveau en IRM. L'aqua ion $[Mn(H_2O)_6]^{2+}$, administré sous forme de $MnCl_2$, a été le premier agent de contraste utilisé par Lauterbur.³ Plus tard, le développement de l'IRM et l'utilisation du $MnCl_2$ ont permis de faire des mesures *in vivo* de l'activité cérébrale et le traçage des voies neuronales.⁴⁻⁵ Une formulation liposomique de $MnCl_2$ (Lumenhance[®]) a été commercialisée en tant qu'agent oral, gastro-intestinal et un complexe de Mn^{2+} (Teslascan[®], $Mn(DPDP)$) a été approuvé pour l'imagerie hépatique, rénale et cardiaque ; les deux actuellement retirés du marché pour des questions financières.

Chapitre 1

En raison des fortes doses administrées lors des examens IRM, le Mn^{2+} doit être complexé pour éviter une éventuelle toxicité. A une concentration élevée, le Mn^{2+} génère une neurotoxicité ($\text{LD}_{50} = 0,22 \text{ mmol/kg}$ pour le rat)⁶ et la surexposition au Mn^{2+} conduit à des symptômes similaires à ceux de la maladie de Parkinson.⁷

Pour une utilisation *in vivo* en tant qu'agent de contraste IRM, ces complexes de Mn^{2+} doivent :

- être stable ;
- avoir une haute inertie ;
- avoir une bonne relaxivité ;
- et un bon profil pharmacocinétique.

La série d'Irving-Williams prédit que la stabilité des complexes formés par des cations divalents de la première série des métaux de transition croît avec la diminution de la taille du métal, or le rayon ionique du Mn^{2+} est plus grand que celui du Zn^{2+} ; en conséquence, les complexes de Zn^{2+} sont plus stables que ceux à base de Mn^{2+} .

Aussi, avoir des complexes ayant une haute inertie est très importante pour éviter le relargage du métal une fois dans l'organisme. Dans l'organisme, la dissociation du complexe est généralement initiée par une protonation et/ou une transmétallation par le biais de cations endogènes divalents, comme le Cu^{2+} ou le Zn^{2+} . Ce dernier est l'un des métaux les plus abondants dans l'organisme.

De ce fait, la conception de ligands dont la disposition spatiale des sites de coordination crée une cage offrant une sphère de coordination parfaitement adaptée au Mn^{2+} pour une bonne stabilité et pour éviter l'initiation de la transmétallation pour une bonne inertie est primordiale.

L'un des défis de la chimie de coordination dans ce domaine est de concevoir des complexes de Mn^{2+} ayant une haute inertie. En effet, par rapport aux complexes de Gd^{3+} , il est plus difficile de créer des chélates de manganèse hautement inertes, car le Mn^{2+} a un rayon ionique plus petit que ceux des lanthanides, plus particulièrement le Gd^{3+} ($r_{\text{Gd}^{3+}}$ est approximativement égal à $1,31 \times r_{\text{Mn}^{2+}}$). Ceci laisse moins de place pour la formation de plusieurs liaisons autour du Mn^{2+} , or ce facteur est très important pour avoir des complexes avec une bonne stabilité et une bonne inertie.

Introduction générale

Dans ce contexte, nous avons exploité une famille de ligands, les bispidines (figure 1.1) qui ont une structure fortement pré-organisée et très rigide comme chélatants du Mn^{2+} . La caractérisation de leurs complexes en tant qu'agents d'imagerie est l'objet de cette thèse.

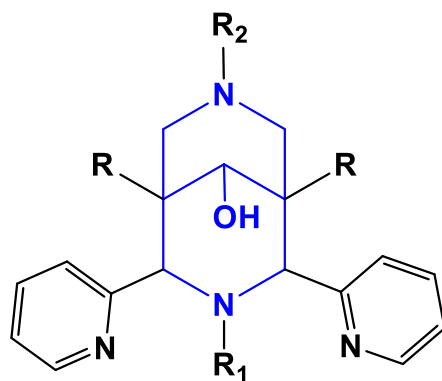


Figure 1.1 : Structure générale de la famille des bispidines étudiées dans cette thèse.

1. Le Manganèse

1.1. Généralités

Le manganèse, de numéro atomique $Z = 25$, est un élément chimique appartenant à la famille des métaux de transition (figure 1.2).

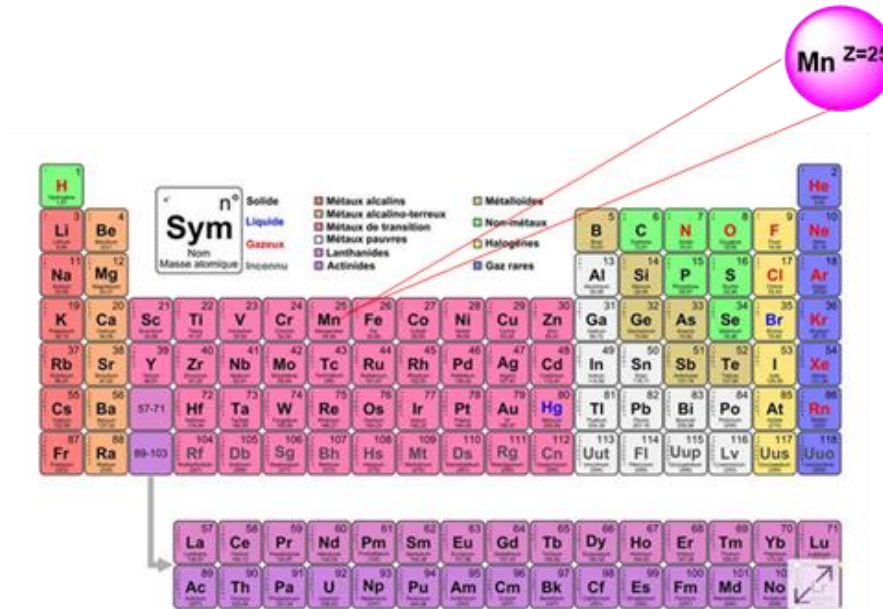


Figure 1.2 : Tableau de classification périodique de Mendeleïev.

Derrière le titane (Ti) et le fer (Fe), le manganèse (Mn) est le troisième métal de transition le plus abondant dans la croûte terrestre. Les minerais sources du manganèse sont la pyrolusite qui est du dioxyde de manganèse (MnO_2), l'hydrate mixte de baryum et de manganèse ($(Ba.H_2O)_2Mn_5O_{10}$), ou encore un carbonate, la rhodochrosite ($MnCO_3$), à la flamboyante couleur lorsqu'elle contient des impuretés.⁸ Environ 90 % de la production de manganèse est utilisée pour la préparation d'alliage, on le retrouve principalement dans les aciers.

Le manganèse est un élément essentiel et on le retrouve naturellement à faible dose dans l'organisme.

Introduction générale

1.2. Propriétés chimiques

La configuration électronique du manganèse à l'état atomique est la suivante : $[\text{Ar}] 4s^2 3d^5$. Comme tous les métaux de transition à l'exception des métaux du groupe 12, la sous-couche électronique d est en remplissage, et des cations, dont cette dernière est incomplète (à l'exception des cations divalents du groupe 12), peuvent être formés.⁹

Le manganèse a plusieurs degrés d'oxydation allant de +1 à +7 et aussi -1, -3.

Le diagramme de Latimer (figure 1.3) représente les états d'oxydation les plus communs du manganèse. Ce dernier a différentes couleurs en fonction de son état d'oxydation.

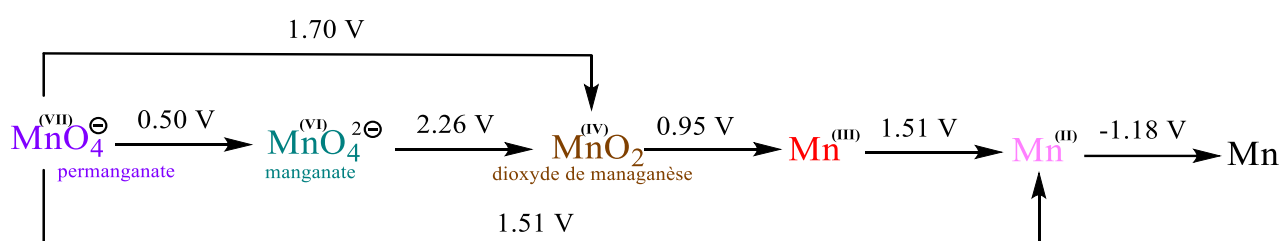


Figure 1.3 : Diagramme de Latimer théorique du Mn à $[\text{H}^+] = 1 \text{ M}$.

L'augmentation du degré d'oxydation s'accompagne de la diminution du rayon ionique pour les oxydes, et également de l'augmentation de l'acidité. En conséquence, les oxydes sont plus faciles à produire en milieu basique.

La structure cristalline principale du manganèse à l'état atomique est cubique.

Le manganèse, plus particulièrement dans son état d'oxydation $2+$ (Mn^{2+}), est impliqué dans certains processus enzymatiques, avec l'exemple du superoxyde dismutase (SOD) qui joue un rôle essentiel dans les défenses anti-oxydantes pour lutter contre le stress oxydatif et le vieillissement des cellules.

Les complexes de manganèse ($\text{Mn}^{2+/3+}$), en fonction de la nature des ligands, ont une large palette d'applications (figure 1.4).

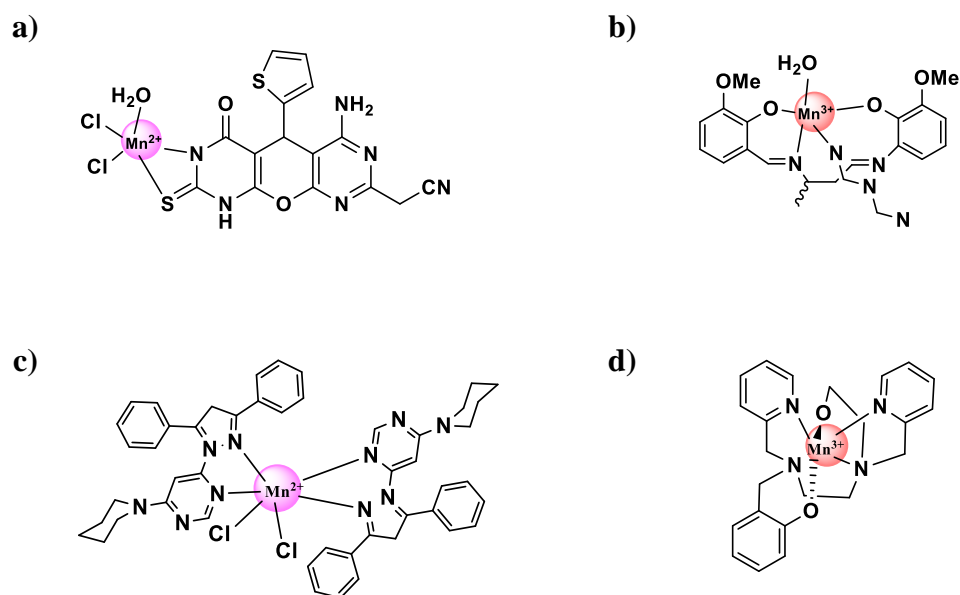


Figure 1.4 : Quelques exemples d'applications de complexes de $Mn^{2+/3+}$: a) Activité anticancéreuse et antimicrobienne ¹⁰ ; b) Activité antioxydante ¹¹ ; c) Activité catalytique ¹² ; d) Applications optico-électroniques ¹³.

Dans la suite, on se focalisera sur le manganèse de degré d'oxydation $2+$ (Mn^{2+}) de configuration électronique $[Ar] 4s^0 3d^5$.

Le Mn^{2+} est un acide de Lewis dur selon la classification de Pearson,¹⁴ donc fortement électropositif et difficile à réduire.

Les atomes donneurs tel que l'azote ou l'oxygène permettent de minimiser l'énergie électrostatique. Les interactions électrostatiques et stériques entre le Mn^{2+} et les ligands gouvernent la géométrie du complexe formé et déterminent le nombre de coordination.¹⁵⁻¹⁶ D'une manière générale, le Mn^{2+} est hexa- ou hepta-coordinné, et les ligands polydentés lui imposent une géométrie particulière.

Le manganèse a plusieurs isotopes dont un seul est stable (^{55}Mn) et représente la totalité du manganèse naturel. Les isotopes ^{51}Mn ($t_{1/2} = 46,2$ min), ^{52}Mn ($t_{1/2} = 5,6$ j), ^{53}Mn ($t_{1/2} = 3,74 \times 10^6$ a), ^{54}Mn ($t_{1/2} = 312,10$ j) sont des radioéléments.

L'isotope 52 ($^{52}Mn^{2+}$) est intéressant pour des applications en tomographie par émission de positrons (TEP), enrichissant la palette d'application du manganèse (figure 1.5).

Le $^{51}Mn^{2+}$ est aussi utilisé pour le marquage de petites molécules.¹⁷

Introduction générale

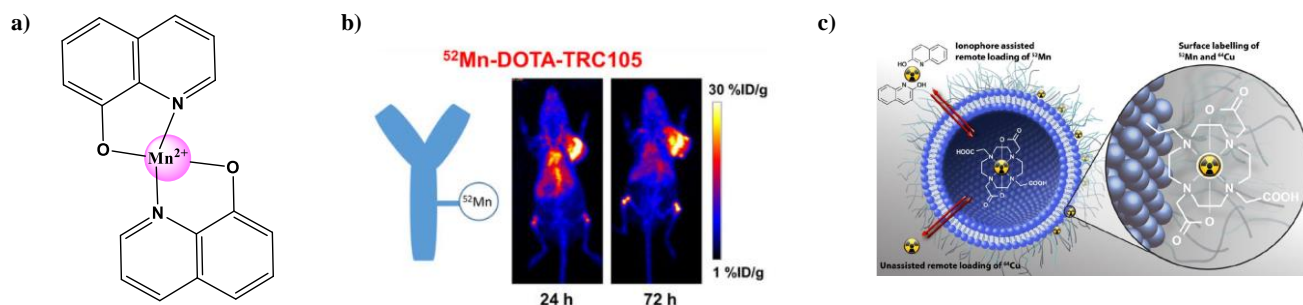


Figure 1.5: a) $^{52}\text{Mn}(\text{oximate})_2$ activité ionophore ¹⁸ ; b) Complexe de ^{52}Mn -DOTA couplé à l'anticorps TRC105 pour la détection des cellules cancéreuses 4T1 ¹⁹ ; c) Radiomarquage de liposomes au ^{52}Mn ou ^{64}Cu en utilisant le DOTA conjugué ou encapsulé en surface pour la détection de tumeurs de type CT26 (carcinome de colon)²⁰.

1.3. Propriétés magnétiques

La présence des cinq électrons non appariés au niveau de sa sous-couche d lui confère des propriétés magnétiques.

Le Mn^{2+} est un ion métallique paramagnétique de spin $S = 5/2$. Le moment magnétique μ_J est calculé par le biais des équations 1.1 et 1.2.²¹

$$\mu_J = g_J \sqrt{J(J+1)} \quad \text{équation 1.1}$$

$$g_J = \frac{3}{2} + \frac{S(S+1) - L(L+1)}{2J(J+1)} \quad \text{équation 1.2}$$

J = moment cinétique global : $\vec{J} = \vec{L} + \vec{S}$; L = moment angulaire ; S = spin.

Le Mn^{2+} a une relaxation électronique lente.

Contrairement aux lanthanides dont les électrons de l'orbitale 4f sont peu influencés par l'environnement chimique, pour le Mn^{2+} , en fonction du ligand qui le chélate, les électrons peuvent être affectés. En conséquence, on peut avoir des complexes de Mn^{2+} à haut ou bas spin (figure 1.6).

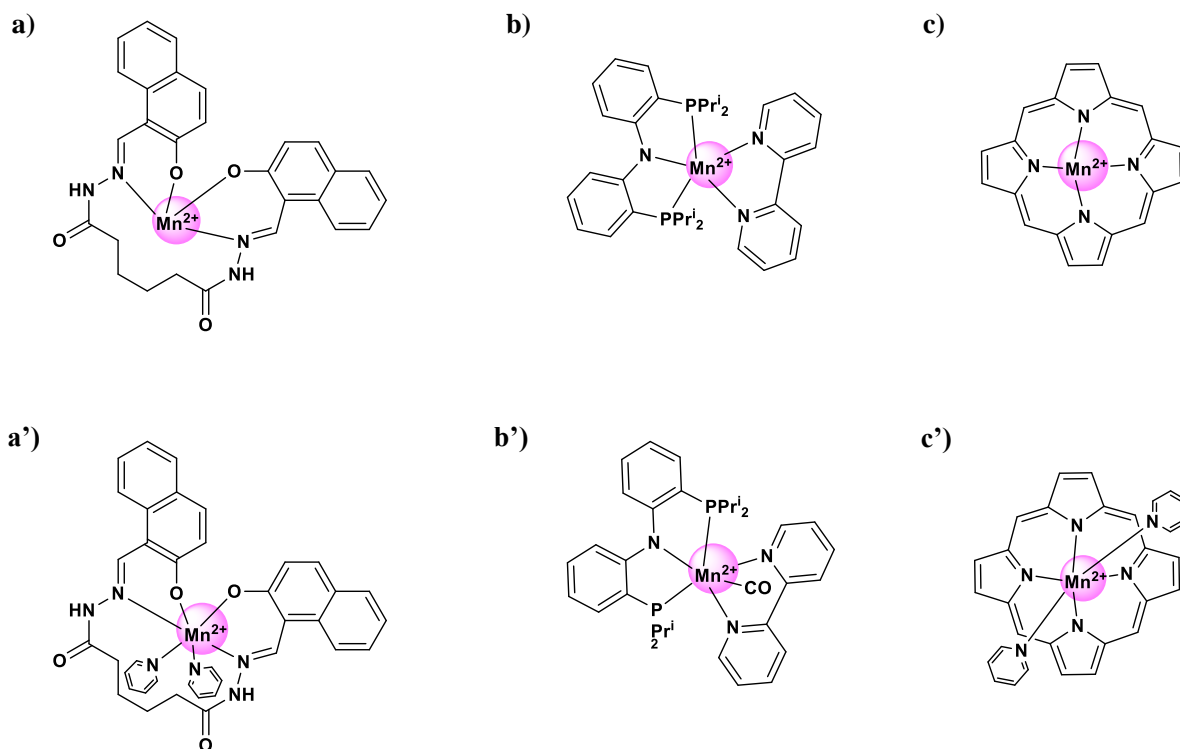


Figure 1.6 : a) ²², b) ²³, c) ²⁴ : Complexes de Mn^{2+} à haut spin ; a') ²², b') ²³, c') ²⁴ : Complexes de Mn^{2+} à bas spin.

2. Généralités sur les agents de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM)

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une technique d'imagerie médicale non-invasive qui permet d'obtenir des images en trois dimensions de l'intérieur du corps avec une résolution submillimétrique. L'IRM est basée sur le principe de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), et met en jeu les propriétés magnétiques des protons des molécules d'eau pour visualiser le corps en fonction de la densité et des temps de relaxation des protons. La résolution obtenue en IRM est relativement élevée, mais dans certaines pathologies, lésions, etc, pour améliorer le diagnostic, l'injection d'un agent de contraste s'avère nécessaire.

2.1. Principe de fonctionnement de l'IRM

Avec la découverte des rayons X en 1895, et la mise au point du scanner (CT : 3D) en 1972, l'imagerie médicale devient un outil de diagnostic essentiel dans le domaine médical. Mais la découverte du phénomène de résonance magnétique nucléaire (RMN) par Felix Bloch et Edwards Mills Purcell en 1946, et son application pour l'imagerie médicale (IRM) ont révolutionné la médecine. La première image IRM chez l'homme a été obtenue en 1977, et en 2003, Paul Christian Lauterbur et Peter Mansfield ont obtenu le prix Nobel en Physiologie et Médecine pour leurs travaux qui ont rendu possible le développement de l'IRM.

Le corps humain est composé essentiellement d'eau et de graisse, et les atomes d'hydrogène en représentent environ 63 %. En IRM, les contrastes sont obtenus par le biais de la densité et des propriétés de relaxation non uniformes de ces hydrogènes à travers leur spin nucléaire ($S = \frac{1}{2}$).

En effet, en absence de champ magnétique extérieur d'intensité B_0 , l'orientation des spins nucléaires des hydrogènes des molécules d'eau est aléatoire (figure 1.7). Une fois le corps placé dans un champ magnétique permanent d'intensité B_0 (entre 0,5-3,0 T pour la plupart des appareils cliniques), les spins nucléaires s'orientent dans la direction du vecteur champ B_0 (figure 1.7) et précessent individuellement autour de ce dernier à une fréquence ν_0 appelée fréquence de Larmor (équation 1.3), suivant leur position d'équilibre. A noter que ces derniers ne précessent pas à la même vitesse angulaire, due à l'inhomogénéité du champ B_0 appliqué.

$$\nu_0 = \gamma / 2\pi \cdot B_0 \qquad \text{équation 1.3}$$

avec ν_0 : Fréquence de Larmor
 γ : Rapport gyromagnétique
 B_0 : Intensité du champ magnétique extérieur

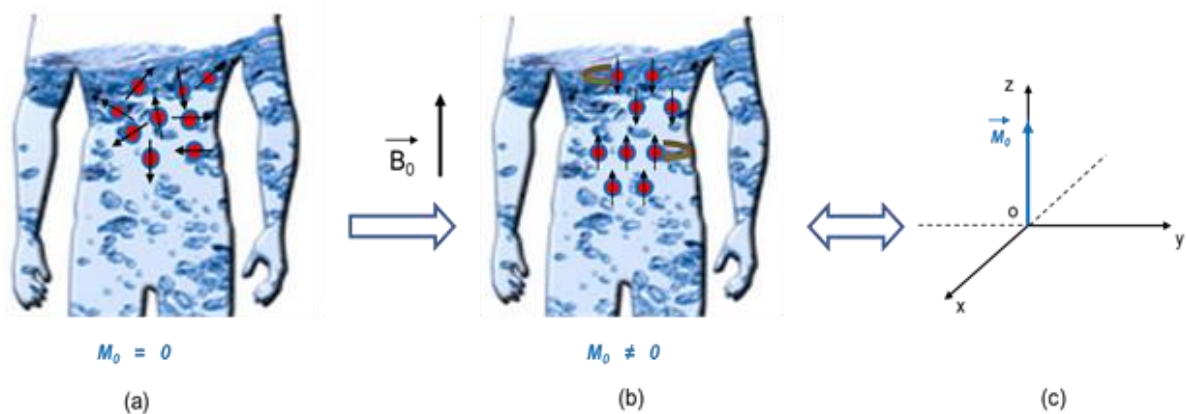


Figure 1.7 : Attitude des spins nucléaires des hydrogènes : (a) en absence de champ magnétique extérieur ; (b) placés dans un champ magnétique permanent d'intensité B_0 ; (c) aimantation macroscopique des spins résultants.

Le résultat est l'apparition d'une aimantation macroscopique reflétant la position des spins résultants (figure 1.7). En appliquant une impulsion de 90° de radiofréquence ν_1 , à partir d'un champ magnétique oscillant d'intensité B_1 perpendiculaire au champ B_0 (figure 1.8), le vecteur de magnétisation M_0 bascule de 90° dans le plan (Oxy) et il en résulte deux composantes : une composante longitudinale (M_z) et une composante transversale (M_{xy}).

La relaxation correspond au retour à l'état d'équilibre de l'aimantation nucléaire d'une manière mono-exponentielle, en se décomposant en deux phénomènes obéissant à des mécanismes très différents.

- La relaxation longitudinale qui correspond à l'interaction enthalpique du noyau excité avec son environnement, et plus particulièrement avec les agents magnétiques (le proton ^1H , les électrons non appariés, par exemple). L'évolution de la magnétisation obéit à une loi de croissance mono-exponentielle (figure 1.8). Elle est caractérisée par le temps de relaxation longitudinale (T_1), qui correspond au temps nécessaire pour que l'aimantation longitudinale atteigne 63 % de sa valeur finale.
- La relaxation transversale est liée aux interactions spins-spins qui créent des hétérogénéités de champ et donc de fréquence de précession. Elle est due au déphasage des spins. Elle est caractérisée par le temps de relaxation transversale (T_2) correspondant au temps mis par l'aimantation transversale pour revenir à 37 % de sa valeur initiale

Introduction générale

(figure 1.8). Dans ce cas, la magnétisation obéit à une loi de décroissance mono-exponentielle (figure 1.8).

La relaxation transversale est plus rapide que la relaxation longitudinale ($T_1 \geq T_2$).

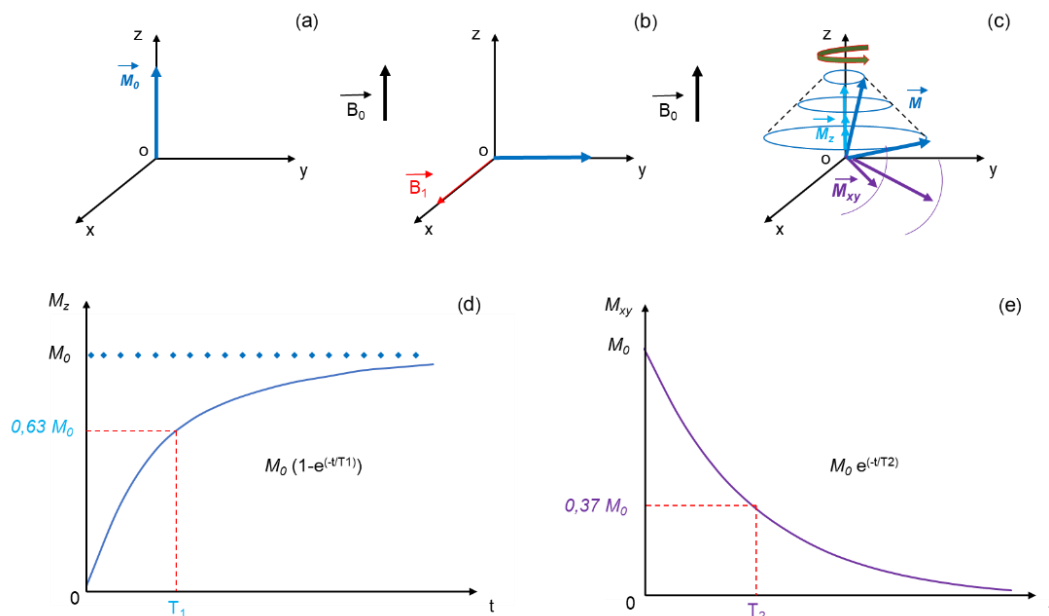


Figure 1.8 : (a) Aimantation macroscopique des spins à l'équilibre ; (b) impulsion de radiofréquence de 90° ; (c) retour à l'état d'équilibre de la magnétisation ; (d) courbe d'évolution de la magnétisation suivant l'axe (Oz) et (e) courbe d'évolution de la magnétisation dans le plan (Oxy).

En fonction du mode d'acquisition en IRM, on pondère l'intensité du signal selon T_1 ou T_2 . Ces temps de relaxation dépendent de l'état physiologique du tissu. L'intensité du signal IRM est fortement liée aussi à la densité nucléaire des hydrogènes. Il existe principalement deux séquences d'acquisition (figure 1.9) : l'écho spin (ES) et l'écho gradient (EG), et le choix des paramètres gouverne le contraste de l'image.

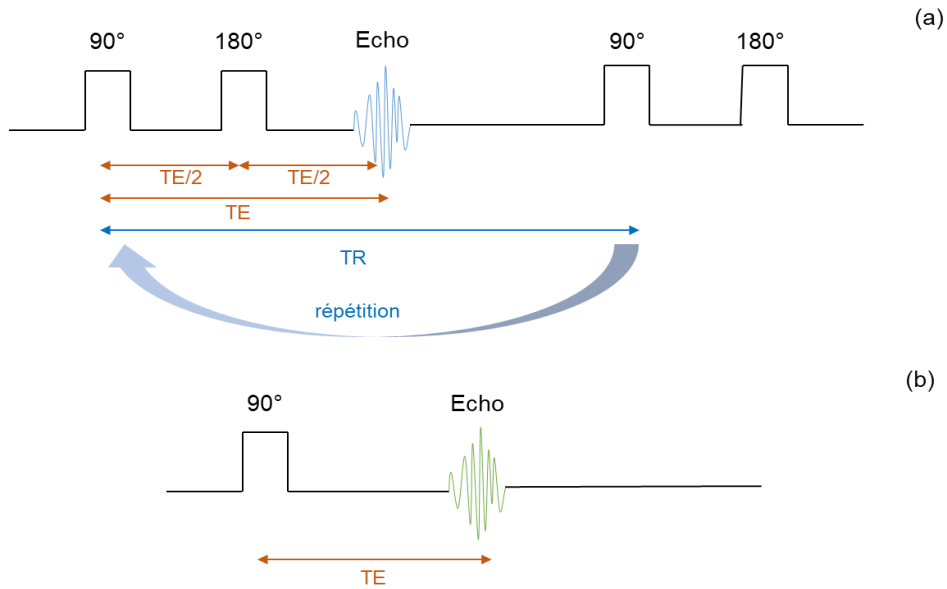


Figure 1.9 : (a) Séquence spin écho (ES) ; (b) Séquence spin gradient (EG). TE = Temps qui s'écoule entre l'impulsion de 90° à l'écho ; TR = Temps de répétition ; TE/2 = Temps nécessaire pour le déphasage après l'impulsion de 180°.

L'impulsion de 180° permet de corriger le déphasage des spins.

Soit deux échantillons A et B, tels que $T_{1A} < T_{1B}$, $T_{2A} < T_{2B}$, et $\rho_A > \rho_B$ (densité d'hydrogène) ; en fonction de leurs paramètres physiques intrinsèques, on peut choisir des valeurs de TR, TE permettant de varier le contraste (figure 1.10). On dit que l'image est pondérée par T_1 , T_2 , ou par la densité protonique.²⁵⁻²⁶

En effet, après une impulsion de 90°, l'évolution du signal est fonction de la valeur des paramètres TE et TR.²⁷ Des TE et TR longs permettent une pondération en T_2 ou en densité protonique; et un TR court une pondération en T_1 .

Introduction générale

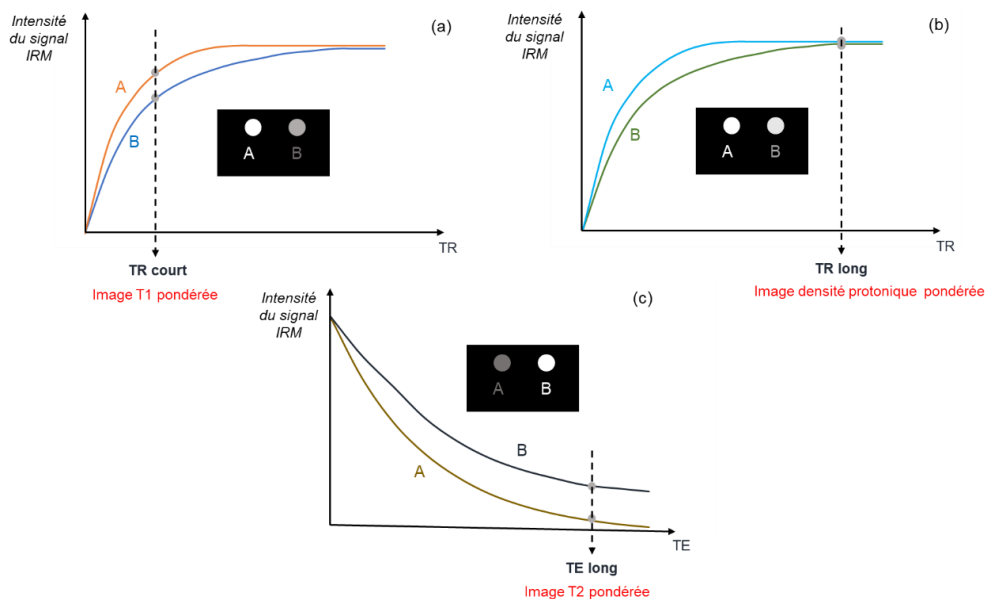


Figure 1.10 : (a-b) Evolution de l'intensité du signal en fonction de TR ; (c) Evolution de l'intensité du signal en fonction de TE.

Cependant, le principal inconvénient de l'IRM est sa faible sensibilité, donc pour certains examens IRM, l'injection d'un agent de contraste est indispensable pour un diagnostic tranchant.

2.2. Les agents de contraste de type T_1 , T_2

Chaque année, des millions de diagnostics en IRM sont réalisés à travers le monde, et environ 40% de ces examens sont améliorés par l'utilisation d'un agent de contraste.²⁸⁻²⁹ Ils permettent d'avoir des images plus nettes du tissu visualisé (figure 1.11).

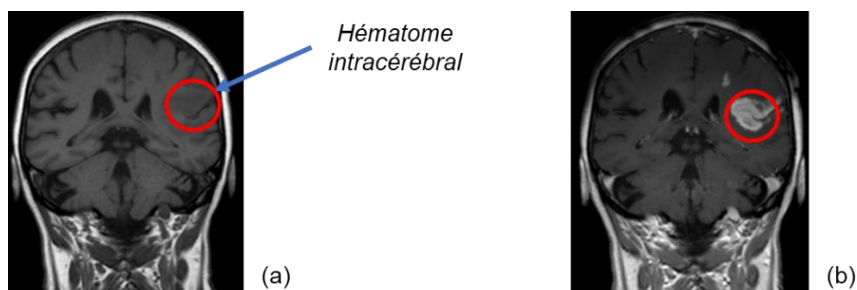


Figure 1.11 : IRM d'un hématome intracérébral. (a) en absence d'agent de contraste ; (b) en présence d'agent de contraste. <https://www.utinam.cnrs.fr/?Gadolinium>.

Chapitre 1

En effet, les agents de contraste accélèrent la relaxation des protons, autrement dit, ils augmentent la vitesse de relaxation longitudinale ($1/T_1$) et transversale ($1/T_2$) par le biais d'interactions entre le spin électronique dû à leurs électrons non appariés et le spin nucléaire du proton. En fonction de leurs propriétés magnétiques, ils sont classés suivant deux familles :

- Les agents de contraste de type T_1 sont des complexes de cations paramagnétiques (Gd^{3+} , Mn^{2+} par exemple). Leur effet sur l'intensité du signal IRM est positif (signal hyperintense).

La plupart des agents de contraste commercialisés sont des complexes de Gd^{3+} de petite taille qui se diffusent rapidement du sang à l'espace extracellulaire. Ils permettent par exemple de faire la détection de tumeurs au niveau du cerveau dont la barrière hémato-encéphalique (BHE) est lésée.

Certains agents de contraste ont la capacité de se lier à l'albumine sérique (HSA) entraînant leur rétention temporelle dans le sang. Ils permettent ainsi de faire l'imagerie des vaisseaux sanguins (angiographie), comme par exemple le MS-325,²⁸ un dérivé du Gd(DTPA) (figure 1.12).

- Les agents de contraste de type T_2 sont des nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer stabilisées par du dextran. Leur effet sur l'intensité est négatif (signal hypointense).

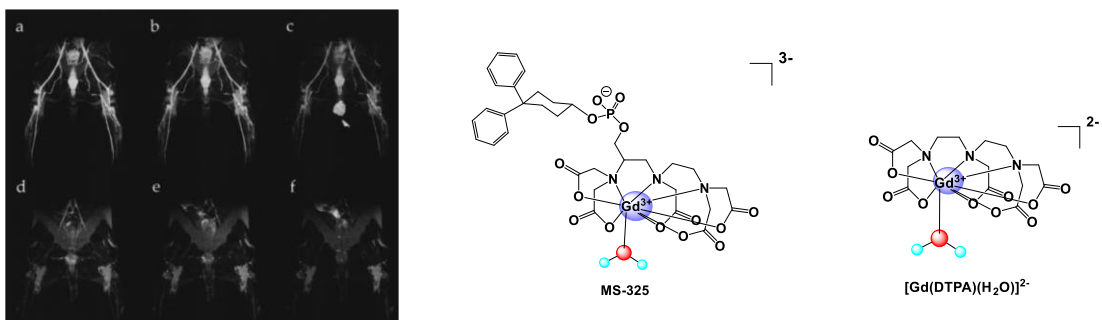


Figure 1.12 : Images IRM de lapin : a-c) après injection de 0,025 mmol/kg de MS-325; d-f) après injection de 0,1 mmol/kg de Gd(DTPA). Les images présentées sont à 5 (a, d), 30 (b, e) et 60 minutes après l'injection (c, f).²⁸

Introduction générale

En imagerie médicale, les agents de contraste de type T_1 sont plutôt favorisés, et le diagnostic clinique est dominé par les agents à base de Gd^{3+} qui raccourcissent les temps d'acquisition et améliorent la fiabilité du diagnostic.³⁰

De nos jours, les avancées de la médecine et de la biologie ont permis de mieux comprendre les mécanismes de causalité de certaines pathologies, en identifiant les biomarqueurs. L'imagerie médicale occupe une place très importante dans ces recherches, en permettant de visualiser ces biomarqueurs, afin de réaliser des diagnostics précoces. Ainsi, on voit naître une nouvelle génération d'agents de contraste qui sont capables de cibler certains tissus en fonction de leur état physiologique ou de la présence de biomarqueurs spécifiques, on parle alors d'agents de contraste responsifs ou ciblés. Ils sont composés principalement de deux unités, dont l'une permet de chélater le centre paramagnétique et l'autre la reconnaissance de biomarqueurs (cations biologiques, protéines, protons par exemple). L'illustration d'un agent de contraste sensible au Zn^{2+} est représentée sur la figure 1.13. La coordination du Zn^{2+} dans la partie complexante prévue à cet effet entraîne la liaison de la molécule entière à la HSA. L'augmentation du poids moléculaire et par conséquent du temps de corrélation rotationnel (τ_{rH}) va conduire à un changement des propriétés de relaxation (relaxivité, r_1), détectable sur les images IRM (figure 1.13).³¹

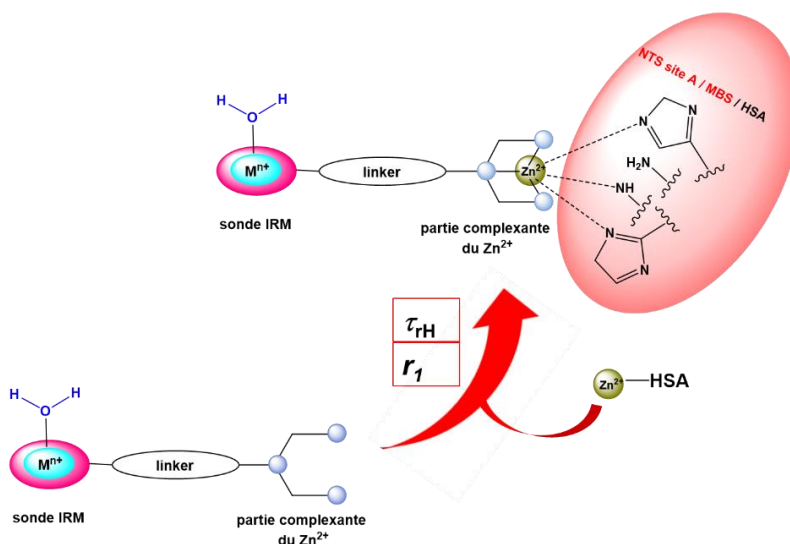


Figure 1.13 : Illustration d'un agent de contraste responsif au Zn^{2+} .

Dans la suite, on se focalisera sur les agents de contraste à base de Mn^{2+} .

2.3. Mécanisme d'action des complexes de Mn^{2+} sur la relaxation des spins nucléaires des hydrogènes de l'eau

Pour la conception d'agents de contraste efficaces pour l'IRM, il est indispensable de comprendre leur mécanisme d'action sur la relaxation des spins nucléaires des hydrogènes. Ce phénomène est décrit par la théorie de Solomon, Bloembergen et Morgan.³²⁻³⁶

La vitesse de relaxation observée ($R_i^{obs} = 1/T_i$) est la somme de la contribution diamagnétique ($1/T_i^{dia}$) et de la contribution paramagnétique ($1/T_i^p$) due à la présence de l'agent de contraste (équation 1.4).

$$R_i^{obs} = R_i^p + R_i^{dia} = 1/T_i^p + 1/T_i^{dia} \quad \text{avec } i = 1, 2 \quad \text{équation 1.4}$$

R_i^p : vitesse de relaxation supplémentaire en présence du complexe paramagnétique ;
 R_i^{dia} : vitesse de relaxation en absence du complexe paramagnétique.

En introduisant à l'équation 1.4, la grandeur de relaxivité (r_i) qui se définit comme l'augmentation de la vitesse de relaxation des protons des molécules d'eau induite par l'agent de contraste de concentration 1 mM, on obtient l'équation 1.5. La relaxivité, exprimée en $mM^{-1}.s^{-1}$, est le paramètre qui caractérise l'efficacité d'un complexe paramagnétique comme agent de contraste en IRM.³⁷

$$R_i^{obs} = R_i^{dia} + r_i^p \times [Mn^{2+}] \quad \text{avec } i = 1, 2 \quad \text{équation 1.5}$$

La relaxivité résulte des contributions de la première sphère de coordination du centre métallique ou sphère interne (inner-sphere IS en anglais), de la sphère externe (outre-sphere OS en anglais), et de la seconde sphère ($2^{nd}S$). Donc, elle est décrite par l'équation 1.6.

$$r_i^p = r_i^p(IS) + r_i^p(OS) + r_i^p(2^{nd}S) \quad \text{avec } i = 1, 2 \quad \text{équation 1.6}$$

❖ Sphère interne : Contrairement aux complexes de Gd^{3+} , dont la contribution de la sphère interne en milieu aqueux est dominée par un mécanisme dipolaire entre les spins nucléaires et électroniques respectivement des hydrogènes des molécules d'eau et du Gd^{3+}

Introduction générale

(figure 1.15), pour le Mn^{2+} un mécanisme de relaxation scalaire peut également être observé.³⁸ L'interaction dipolaire diminue rapidement avec la distance $r_{\text{Mn-H}}$ en r^{-6} (figure 1.15). La distance $r_{\text{Mn-H}}$ ($\sim 2,8 \text{ \AA}$) est plus courte que celle entre le Gd^{3+} et le noyau de l'hydrogène ($r_{\text{Gd-H}}$ $\sim 3,1 \text{ \AA}$).

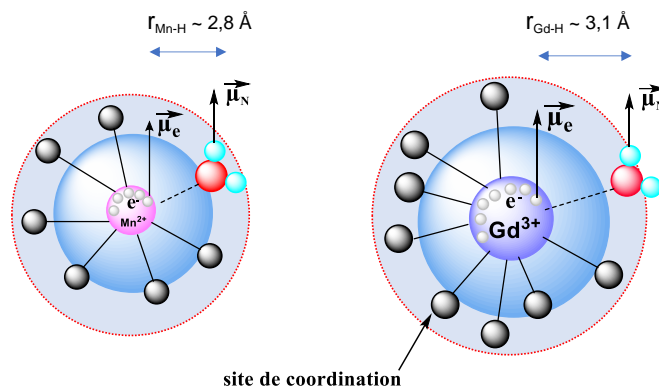


Figure 1.15 : Illustration d'un complexe de Mn^{2+} et Gd^{3+} avec les distances qui séparent les spins nucléaires (μ_N) et électroniques (μ_e).

La présence d'une interaction scalaire a pour conséquence l'apparition d'une seconde dispersion entre les fréquences 0,02 et 0,5 MHz du profil NMRD (Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion : qui représente l'évolution de la relaxivité en fonction de la fréquence) de l'ion $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ contrairement à $[\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_8]^{3+}$ (figure 1.16).³⁹

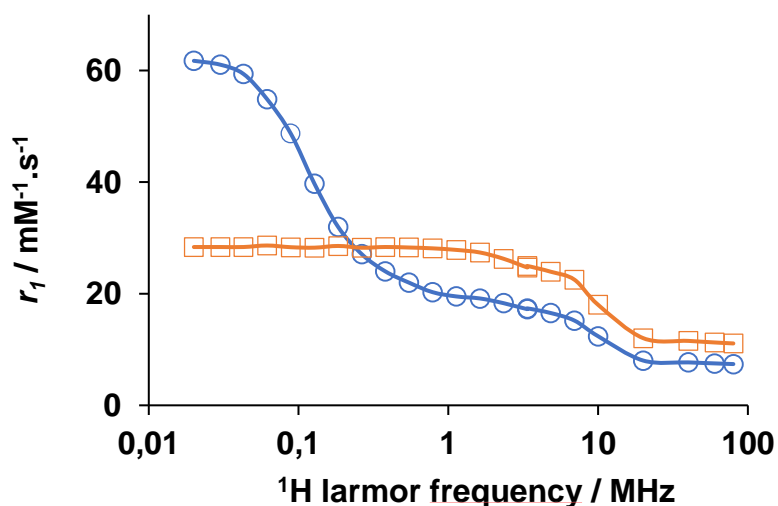


Figure 1.16 : Profil NMRD des complexes $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ (\circ) et $[\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_8]^{3+}$ (\square) à 25 °C.

Chapitre 1

Ce phénomène est rarement observé pour les complexes de Mn^{2+} avec des ligands autres que des molécules d'eau. Le manganèse hexa-hydraté $[Mn(H_2O)_6]^{2+}$ avec sa géométrie octaédrique et symétrique, induit une très lente relaxation du spin électronique qui permet de mieux observer la contribution scalaire.³⁸

❖ Sphère externe : La contribution de la seconde sphère de coordination est proportionnelle à $S(S+1)$ (équation 1.7), un facteur qui est plus petit pour le Mn^{2+} (8,75) que pour le Gd^{3+} (15,75).³⁸

A noter qu'il est très difficile de moduler la contribution de la sphère externe à la relaxivité.

$$r_{1p,OS} = \frac{32N_A\pi}{405} \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\gamma_S^2\gamma_I^2}{a_{MnH}D_{MnH}} S(S+1) [3J_{OS}(\omega_I; T_{1e}) + 7J_{OS}(\omega_I; T_{2e})] \quad \text{équation 1.7}$$

N_A : nombre d'Avogadro ;

γ_S : rapport gyromagnétique électronique de l'électron ;

γ_I : rapport gyromagnétique nucléaire du proton ;

a_{MnH} : distance entre le centre paramagnétique et la molécule d'eau la plus proche de la sphère externe ;

D_{MnH} : coefficient de diffusion relative du mouvement de translation ;

S : nombre quantique de spin électronique ;

ω_I : fréquence de Larmor du proton ;

$T_{ie} (i=1,2)$: temps de relaxation électronique longitudinale et transversale.

En fonction de la nature chimique des groupements qui se trouvent au sein du ligand qui complexe le centre paramagnétique, on peut avoir un mécanisme de relaxation supplémentaire. Ce phénomène, appelé contribution de la seconde sphère de coordination, est dû à des interactions spécifiques (par exemple liaisons hydrogène) entre certains groupements fonctionnels du ligand et les molécules d'eau environnantes. La conséquence est la rétention temporelle de ces molécules d'eau à une certaine distance du centre paramagnétique (figure 1.17).

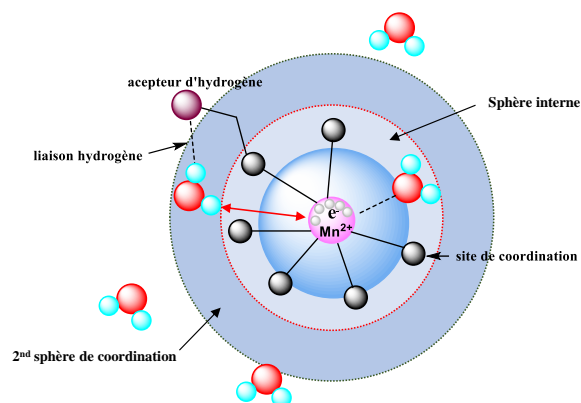


Figure 1.17 : Illustration de la contribution de la seconde sphère de coordination.

2.4. Paramètres influençant sur la contribution de la sphère interne sur la relaxivité

La rationalisation de la relation entre la structure chimique des complexes et leurs propriétés physico-chimiques est primordiale pour un chimiste, afin de concevoir des agents de contraste efficaces. De ce fait, la compréhension des paramètres qui gouvernent la relaxivité est importante.

Pour un complexe de Mn^{2+} donné, les paramètres qui modulent la relaxivité par le biais de la première sphère de coordination sont principalement le nombre de molécule d'eau au sein de la première sphère de coordination (q), le temps de corrélation rotationnel (τ_{rH}), et la vitesse d'échange des molécules d'eau (k_{ex} ; figure 1.18).

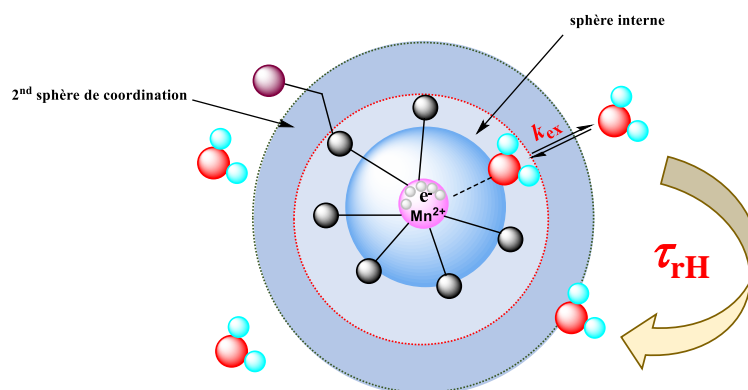


Figure 1.18 : Illustration d'un complexe de Mn^{2+} monohydraté. k_{ex} : vitesse d'échange de la molécule d'eau ; τ_{rH} : temps de corrélation rotationnelle.

- q : nombre de molécules d'eau au sein de la première sphère de coordination

La contribution de la sphère interne à la relaxivité est directement proportionnelle au nombre de molécules d'eau coordonnées (équation 1.8). Donc l'augmentation du nombre de molécules d'eau améliore la relaxivité. Néanmoins, cette action peut entraîner une diminution de la stabilité et de l'inertie cinétique, ou un risque de substitution des molécules d'eau par des anions endogènes (phosphates, citrates, carbonates).⁴⁰

Pour les complexes de Mn^{2+} , le nombre de molécules d'eau (q) peut être déterminée par une méthode proposée par le Dr. Peter Caravan et ses collègues ; elle se base sur la détermination du maximum de la courbe d'évolution de la vitesse de relaxation transversale de l' ^{17}O en fonction de la température.⁴¹

$$r_{1p,is} = \frac{c.q}{55.55} \times \frac{1}{T_{1m}^H + \tau_m} \quad \text{équation 1.8}$$

- c : concentration du complexe paramagnétique ;
- q : nombre de molécules d'eau dans la sphère interne ;
- T_{1m}^H : temps de relaxation longitudinale du spin nucléaire du proton de la molécule d'eau liée ;
- τ_m : temps de résidence de la molécule d'eau dans la première sphère de coordination.

- τ_{rH} : temps de corrélation rotationnel

La relaxivité est fortement liée au temps de relaxation longitudinale (T_{1m}^H) ; et les équations 1.9 et 1.10 montrent la corrélation qui existe entre T_{1m}^H et le temps de corrélation rotationnel.

$$\left(\frac{1}{T_{1m}^H}\right) = \frac{2}{15} \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right) \frac{\gamma_I^2 g^2 \mu_B^2}{r_{MnH}^6} S(S+1) \left(\frac{3\tau_{d1}}{1+\omega_I^2 \tau_{d1}^2} + \frac{7\tau_{d2}}{1+4\omega_S^2 \tau_{d2}^2}\right) \quad \text{équation 1.9}$$

$$\frac{1}{\tau_{di}} = \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{\tau_m} + \frac{1}{T_{1m}} \quad \text{avec } i = 1,2 \quad \text{équation 1.10}$$

T_{1m}^H : temps de relaxation longitudinale du spin nucléaire des protons de la molécule d'eau liée ;

γ_I : rapport gyromagnétique nucléaire du proton ;

μ_B : magnéton de Bohr ;

g : facteur de Landé pour l'électron non apparié ;

r_{MnH} : distance entre le spin nucléaire du proton et le spin électronique du Mn^{2+} ;

S : nombre quantique de spin électronique ;

$\tau_{di} (i = 1, 2)$: temps de corrélation relatif à la dynamique du couple S-I ;

$\omega_{I,S}$: fréquence de Larmor du proton et de l'électron.

Introduction générale

Généralement, la relaxivité des agents de contraste de petite taille est limitée par la rotation rapide du complexe en solution. De ce fait, l'augmentation du poids moléculaire *via* des liaisons covalentes ou non-covalentes avec des macromolécules (par exemple HSA, peptide) ou nanoparticules augmente la relaxivité.³⁸ On observe alors une « bosse » sur le profil NMRD entre les fréquences 20-80 MHz due à la rotation lente du complexe (figure 1.19-a).

A ces fréquences, la relaxivité est souvent proportionnelle au poids moléculaire dans une même famille de complexes (figure 1.19-b).⁴²

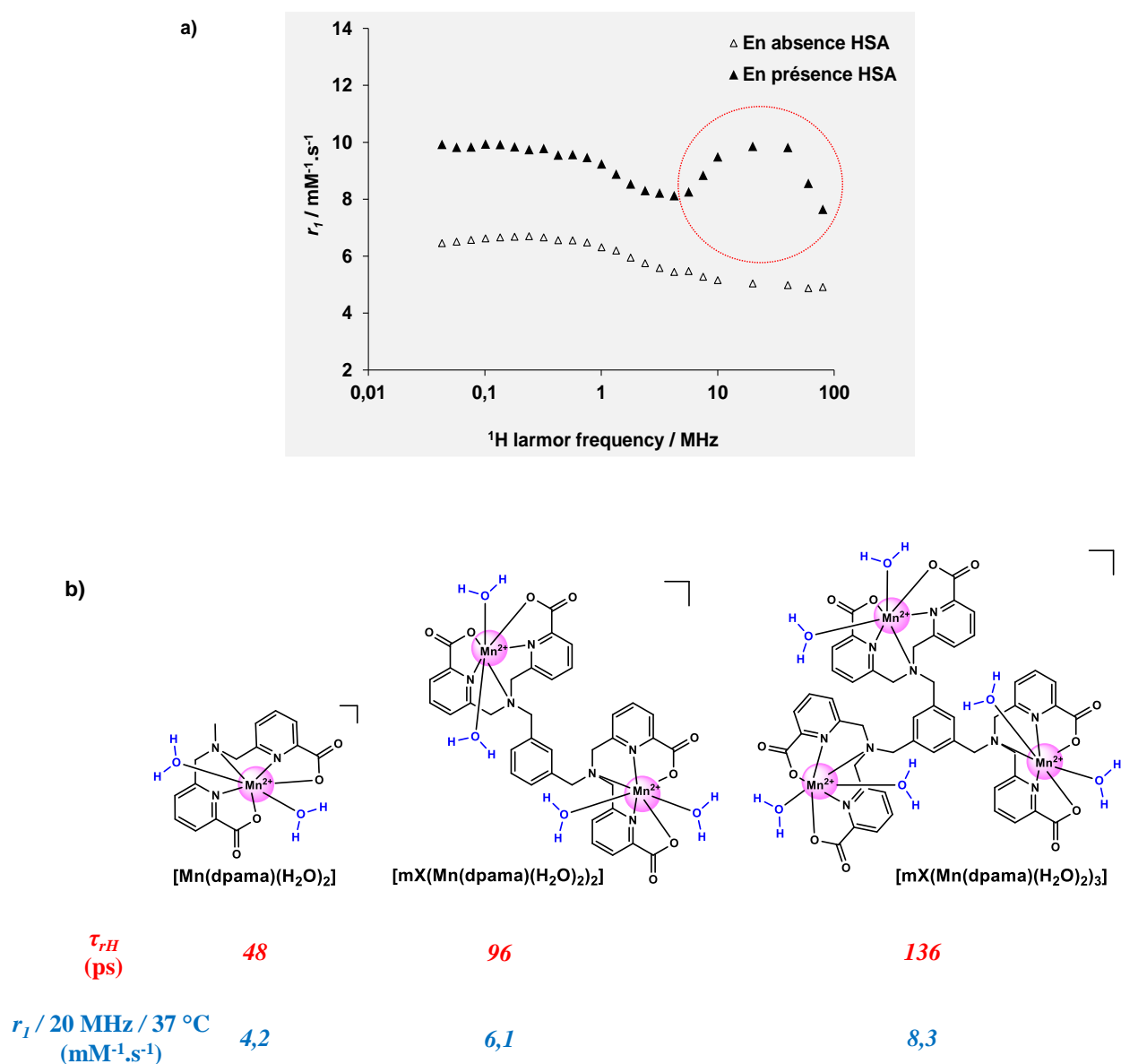


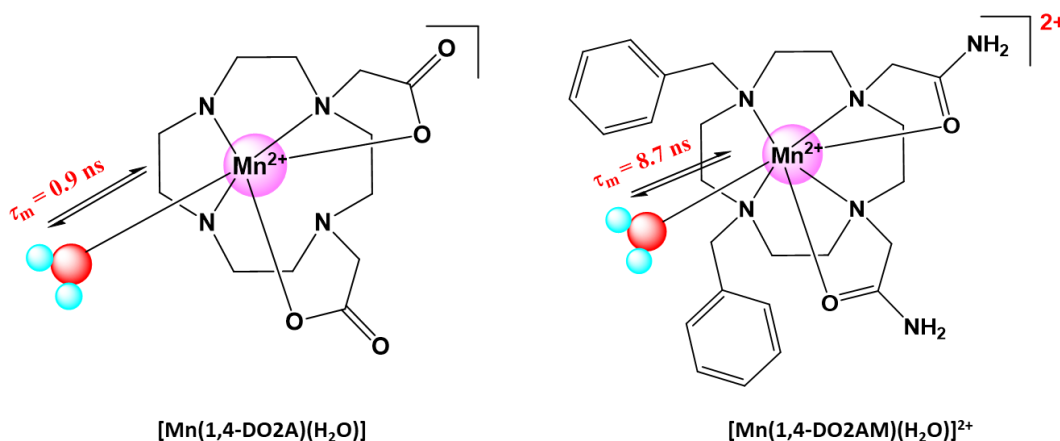
Figure 1.19 : (a) : Illustration du profil NMRD d'un complexe en présence et absence d'HSA ; (b) : l'évolution de la relaxivité longitudinale (r_1) en fonction du temps de corrélation rotationnel (τ_{rH}).

Chapitre 1

- k_{ex} : vitesse d'échange des molécules d'eau

La relaxivité est aussi liée au temps de résidence de la molécule d'eau coordonnée au sein de la sphère interne (τ_m : égal à l'inverse de la vitesse d'échange d'eau ; équation 1.8).

L'architecture du ligand et la charge du complexe sont des facteurs déterminants sur la vitesse d'échange de la molécule d'eau. En fonction du mécanisme d'échange mis en jeu, la charge peut avoir un effet différent. Par exemple, pour un mécanisme dissociatif (voir plus bas), l'augmentation de la charge positive renforce le lien qui existe entre le Mn^{2+} et la molécule d'eau coordonnée qui est un dipôle, et ralentit l'échange de la molécule d'eau (figure 1.20).⁴³⁻⁴⁴ Des contraintes stériques peuvent aussi influencer sur l'échange.



*Figure 1.20 : Illustration de l'effet de la charge du complexe sur le temps de résidence de la molécule d'eau au sein de la sphère interne.*⁴³⁻⁴⁴

Le mécanisme de l'échange d'eau au sein d'un complexe métallique peut être dissociatif ou associatif, en analogie avec la substitution nucléophile 1 (SN_1) et la substitution nucléophile 2 (SN_2) (figure 1.21). Dans un échange dissociatif, caractérisé par un volume d'activation ΔV^\ddagger positif, l'étape déterminante est le départ de la molécule d'eau. A l'inverse, dans un échange associatif (ΔV^\ddagger négatif), c'est l'arrivée de la nouvelle molécule d'eau qui sera l'étape déterminante pour la vitesse. On parle d'un mécanisme concerté quand le départ de la molécule d'eau partante et l'arrivée de la molécule entrante se font en parallèle (ΔV^\ddagger zéro). En réalité, il existe un continuum entre les deux cas limites, c'est-à-dire entre les mécanismes purement dissociatif ou purement associatif.

Introduction générale

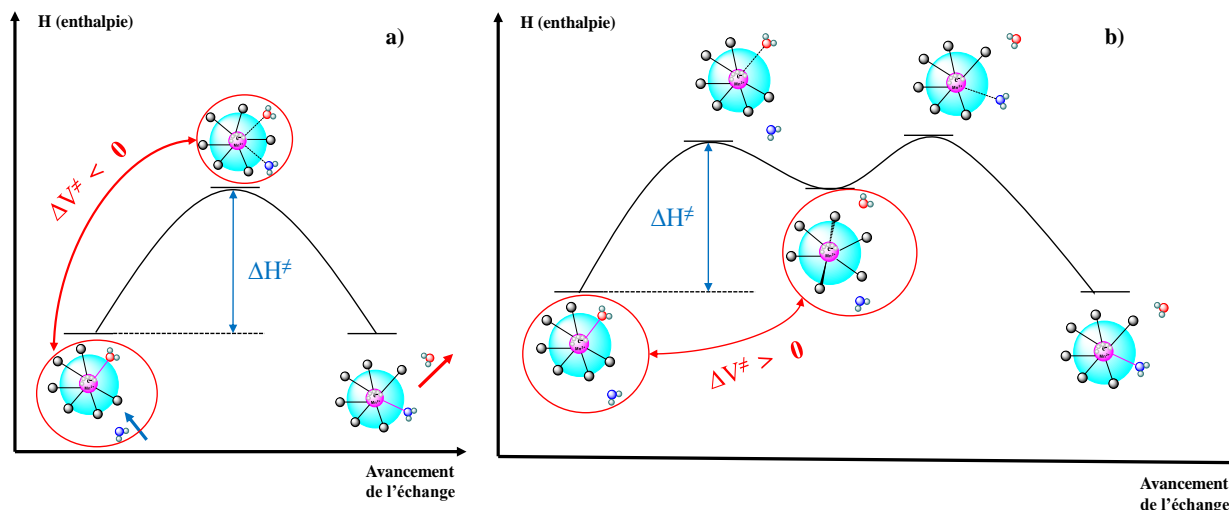


Figure 1.21 : Diagramme d'énergie et illustration des mécanismes d'échange de la molécule d'eau entre le sphère interne et le solvant. a) mécanisme associatif ; b) mécanisme dissociatif. ΔH^\ddagger : enthalpie d'activation et ΔV^\ddagger : volume d'activation.

Pour concevoir des agents de contraste efficaces, le chimiste doit optimiser tous ces paramètres qui rentrent en jeu. Cependant, le plus grand défi en chimie de coordination reste à combiner efficacité, bonne stabilité et haute inertie pour éviter une éventuelle toxicité du centre paramagnétique une fois dans l'organisme, où il sera en compétition avec des cations endogènes, pouvant mener au dysfonctionnement de certains processus métaboliques.

3. Généralités sur les sondes pour la tomographie par émission de positons (TEP)

La tomographie par émission de positons (TEP) est une technique d'imagerie médicale utilisée en médecine nucléaire, basée sur la désintégration des radiotraceurs ou radiopharmaceutiques administrés aux patients.

Au regard de l'IRM, la TEP est hautement sensible (la quantité de radiotraceur nécessaire pour obtenir une image TEP est de l'ordre de la picomole), mais avec une moindre résolution spatiale (TEP : 1-2 mm ; IRM : 25-100 μm).

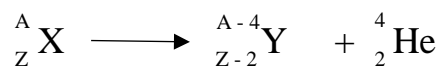
La TEP voit le jour dès les années 1950, avec la première machine conçue au Laboratoire de Recherche de Physique au Massachusetts General Hospital, utilisée pour la détection de tumeurs cérébrales.⁴⁵

3.1. Les radiopharmaceutiques pour la TEP

Certains isotopes sont instables du fait qu'ils renferment au sein de leur noyau un excès de protons et/ou de neutrons. En tendant vers un état stable, ces isotopes se transforment en émettant des particules de matière (électrons, noyaux d'hélium, neutrons, etc) et de l'énergie (photons et énergie cinétique) : ce phénomène est la radioactivité.

En fonction de la particule émise, on distingue trois types de désintégration :

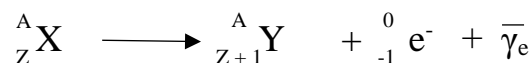
- Alpha (α) : émission d'un noyau d'hélium, selon l'équation suivante :



- Béta plus (β^+) : émission d'un positon, selon l'équation suivante :



- Béta moins (β^-) : émission d'un électron, selon l'équation suivante :



Introduction générale

L'éjection de ces particules s'accompagne d'une émission de rayonnement électromagnétique de grande énergie : le rayonnement gamma (γ), résultant de l'excès d'énergie que renferment les noyaux après une désintégration de type α ou β .

Avec cette propriété de transformation spontanée en d'autres éléments, en émettant de l'énergie sous forme de rayonnement, ces isotopes sont appelés radionucléides, ou radioisotopes.⁴⁶

Ces derniers sont caractérisés par leur mode de désintégration et leur temps de demi-vie ou période (T), correspondant à la durée au bout de laquelle pour un échantillon donné, la moitié des radionucléides est désintégrée. La loi de la décroissance radioactive est mono-exponentielle (équation 1.11) et la vitesse de désintégration des noyaux (nombre de désintégration par seconde : dps) représente l'activité, exprimée en Becquerel (Bq).

$$N(t) = N_0 \times e^{-\lambda t} \quad \text{équation 1.11}$$

N : Nombre de noyaux à l'instant t ;

N_0 : Nombre de noyaux à l'instant t_0 ;

λ : Constante radioactive (désintégration).

Pour la TEP, les radiopharmaceutiques utilisés sont des émetteurs de positons (désintégration de type β^+).

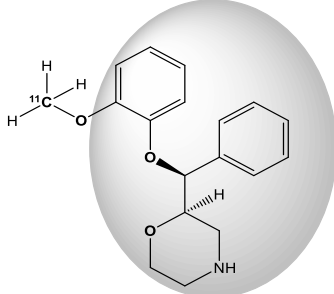
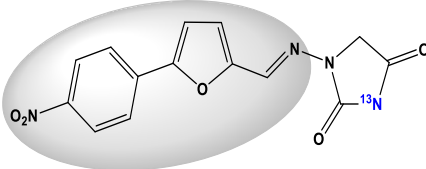
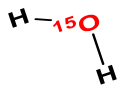
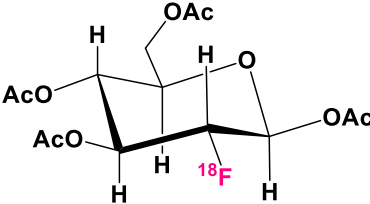
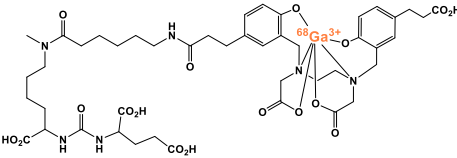
Les premiers radiotraceurs utilisés en TEP sont basés sur des radionucléides non métalliques (tableau 1.1) insérés dans des molécules organiques. Le radiotraceur le plus répandu dans la clinique est le [^{18}F]-fluoro-2-déoxy-D-glucose (FDG), utilisé dans plus de 90 % des examens TEP.⁴⁷ La voie principale de la production de ces radiotraceurs est la synthèse organique par insertion du radioisotope à une étape de la synthèse, suivie de purification et caractérisation ; et face à leur courte période, leur production devient une vraie contrainte sur le plan logistique.

Certaines applications, comme le suivi des processus biologiques lents, nécessitent des radiotraceurs avec une période plus longue. Par exemple, la biodistribution des anticorps monoclonaux peut prendre plusieurs heures voire plusieurs jours après injection (immuno-TEP). Dans ce contexte, le développement de radiopharmaceutiques à partir de radioisotopes ayant un temps de demi-vie plus long devient intéressant, tels que certains radiométaux complexés (tableau 1.1) dont le manganèse 52 (^{52}Mn , T = 5,6 j). Les radiopharmaceutiques peuvent être utilisés seuls, sous une forme chimique simple ; ou liés à des « vecteurs »

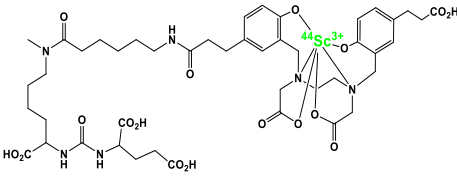
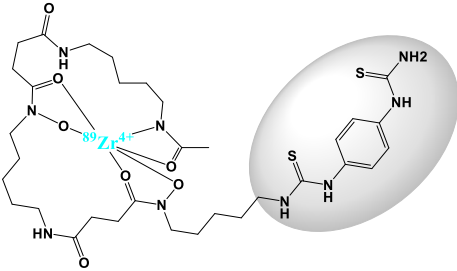
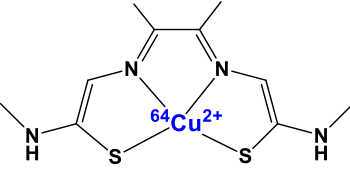
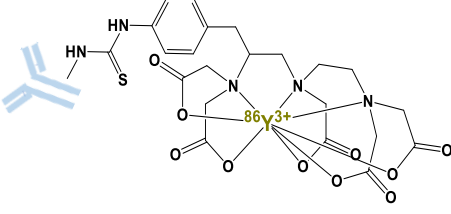

Chapitre 1

(molécules organiques , anticorps monoclonaux par exemple) spécifiques à un biomarqueur de pathologie.

Tableau 1.1 : Exemples de radiotraceurs pour la TEP et leurs applications.

Radiopharmaceutique	Période (h)	Structures	Applications
(S,S)-[¹¹ C]-methylreboxetine	0,34		Utilisé en diagnostic du cancer, maladies cardiovasculaires, et neuro inflammation, ⁴⁸ par exemple pour la détection du transporteur de la noradrénaline (TNA) . ⁴⁹
[¹³ N]-dantrolene	0,17		Substrat des protéines résistantes au cancer du sein, largement distribuées dans le BHE. Il est utilisé pour visualiser l'intestin, la vésicule biliaire. ⁵⁰
[¹⁵ O]-H ₂	0,03		Imagerie du flux sanguin cérébral pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer. ⁵¹
[¹⁸ F]-FDG	1,83		Diagnostic de plusieurs types de cancer et de maladies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer. Récemment utilisé pour évaluer l'inflammation de patients atteints de Covid-19 asymptomatiques. ⁵²⁻⁵⁵
[⁶⁸ Ga]-PSMA	1,03		Premier radiopharmaceutique de ⁶⁸ Ga validé par le FDA pour le diagnostic du cancer de la prostate. ⁵⁶⁻⁵⁷

Introduction générale

<p>[⁴⁴Sc]-PSMA</p>	<p>3,97</p>		<p>Même structure que [⁶⁸Ga]-PSMA, avec une période plus longue, il pourrait être une alternative par rapport à ce dernier.⁵⁸</p>
<p>[⁸⁹Zr]-DBN</p>	<p>78,40</p>		<p>Utilisé en immuno-PET grâce à sa longue demi-vie, pour diagnostiquer l'insuffisance cardiaque.⁵⁹⁻⁶⁰</p>
<p>[⁶⁴Cu]-ATSM</p>	<p>12,70</p>		<p>Permet d'évaluer l'hypoxie tumorale.⁶¹</p>
<p>[⁸⁶Y]-CHX-A-DTPA-cetuximab</p>	<p>14,70</p>		<p>Utilisé en TEP, dont le cetuximab (anticorps monoclonal) est approuvé pour le traitement des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique exprimant l'HER1.⁶²</p>
<p>[⁵²Mn]-Cl₂</p>	<p>134,40</p>		<p>Radiotracer des voies neuronales.⁶³</p>

La production des radioisotopes est assurée par des générateurs et dans la plupart des cas par un cyclotron. Ce dernier inventé par Ernest Orlando Lawrence, est un appareil formé de deux « dees » séparés d'un petit intervalle, où une différence de potentiel est appliquée (figure 1.22). Les particules (proton, hélium, deuteron par exemple) émises depuis le centre du cyclotron subissent l'effet du champ magnétique B appliqué, perpendiculaire à leur vitesse, qui a pour conséquence la courbure de leur trajectoire. La différence de potentiel appliquée accélère la

Chapitre 1

particule lors de son passage entre les deux « dees » entraînant une augmentation graduelle de leur vitesse et du rayon de leur trajectoire (figure 1.22).

Une fois éjectée du cyclotron, la particule rentre en collision avec sa cible (atome naturel en général), donnant une réaction nucléaire décrite de la manière suivante : $X(y,z)Y$, avec X : élément que constitue la cible ; y : particule incidente, z : particule émise ; Y : élément produit. L'intensité du courant appliquée et l'énergie du faisceau sont des paramètres qui influencent sur le rendement.

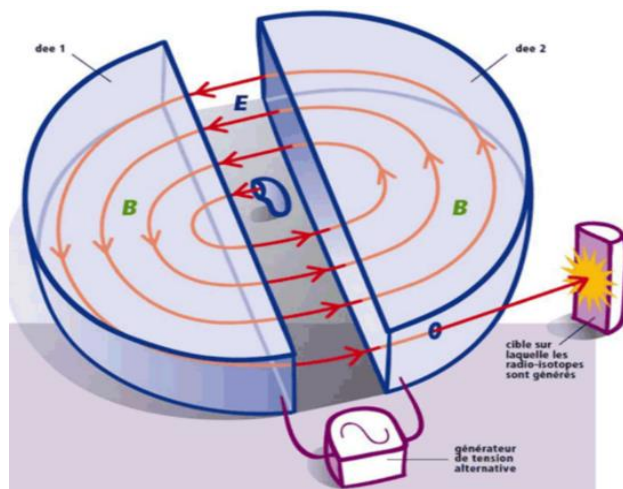


Figure 1.22 : Principe de fonctionnement d'un cyclotron.⁶⁴

La production du ^{52}Mn pour des applications médicales a été réalisée pour la première fois en France en lien avec cette thèse. La production du manganèse 52 par le cyclotron du campus d'Orléans, au CEMHTI, est détaillée dans la partie expérimentale.

3.2. Principe de fonctionnement de la TEP

La tomographie par émission de positons (TEP) repose sur le principe de la scintigraphie, consistant à administrer un radiotracer pour obtenir une image fonctionnelle ou caractéristique de la présence d'un biomarqueur. Le positon (antiparticule de l'électron) émis par le radionucléide rentre en collision à quelques millimètres près du noyau radioactif avec un

Introduction générale

électron, ayant pour conséquence la conversion de la masse de ces derniers en énergie électromagnétique, comme le décrit l'équation 1.12, d'où le nom d'annihilation.

$$E = mc^2 \quad \text{équation 1.12}$$

Le phénomène d'annihilation produit deux photons de même énergie (511 KeV), ayant la même direction, mais de sens opposé. La détection de la trajectoire de ces photons par la caméra TEP permet de localiser le lieu de leur émission (figure 1.23). Le signal détecté est une information quantitative que l'on représente sous la forme d'une image faisant apparaître en couleur les zones de forte concentration du radiotracer.⁶⁵

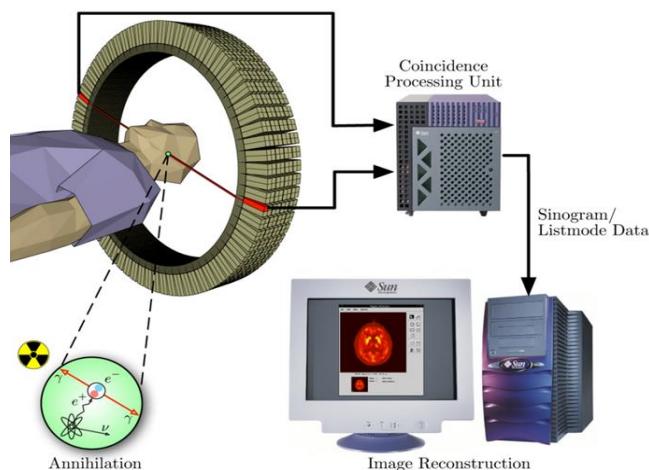


Figure 1.23 : Schéma du processus d'acquisition d'image en TEP.⁶⁶

Des applications des isotopes de manganèse en tant que traceurs TEP ou pour des études chez l'homme ont été réalisées pour la première fois dans les années 1970, pour l'évaluation de la perfusion myocardique⁶⁷⁻⁶⁹ ou de l'absorption de manganèse chez l'homme.⁷⁰

On rappelle que le manganèse est le seul élément chimique permettant de réaliser une imagerie bimodale avec ses différents isotopes ($^{55}\text{Mn}^{2+}$: IRM / $^{52}\text{Mn}^{2+}$: TEP).

4. Propriétés physico-chimiques des complexes de manganèse pour l'imagerie résonance magnétique (IRM)

Même si l'utilisation de l'agent de contraste $[\text{Mn}(\text{DPDP})]^{4-}$ (figure 1.24), qui se dissocie partiellement une fois dans l'organisme n'a pas posé de problème de toxicité, il est aujourd'hui indispensable de concevoir des agents de contraste à base de Mn^{2+} avec des ligands qui offrent une bonne stabilité et une haute inertie pour des applications cliniques. Ainsi, l'étude des propriétés physico-chimiques des complexes de Mn^{2+} et plus particulièrement de leur stabilité et leur inertie est primordiale avant toute étude *in vivo*.

Dans le but de s'affranchir les obstacles qui entravent la conception des agents de contraste à base de Mn^{2+} , une palette de ligands a été développée durant ces dernières années. Ici nous allons présenter l'essentiel de ces résultats selon la structure des ligands.

4.1. Complexes de Mn^{2+} basés sur des ligands linéaires

4.1.1. Dérivés de l'EDTA

Le $[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$ et ses dérivés ont été parmi les premiers complexes de Mn^{2+} étudiés par rapport à leurs propriétés de relaxation, dès les années 1970. Le $[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$ est hepta-coordiné, avec une molécule d'eau au sein de sa première sphère de coordination. Les vitesses d'échange d'eau, déterminées par RMN de ^{17}O pour $[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$ et ses dérivés $[\text{Mn}(\text{PhDTA})]^{2-}$ et $[\text{Mn}(\text{CDTA})]^{2-}$ (figure 1.24) sont supérieures d'un ordre de grandeur à celle de l'ion aqua $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ ($k_{\text{ex}} = 21 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$).⁷¹⁻⁷⁴ Des mesures du volume d'activation par RMN de ^{17}O à pression variable ont permis d'attribuer un mécanisme dissociatif aux complexes $[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$ et $[\text{Mn}(\text{CDTA})]^{2-}$ ($\Delta V^\ddagger = +3,0$ et $+9,4 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$, respectivement), tous les deux hepta-coordinés, alors que le mécanisme est associatif pour le $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ ($\Delta V^\ddagger = -5,4 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$), qui est hexa-coordiné,⁷⁵ avec une géométrie octaédrique.

Plus récemment, dans un but de développer des agents angiographiques à base de Mn^{2+} , l'EDTA a été modifié en y greffant des groupements hydrophobes qui favorisent la liaison à l'albumine sérique humaine (HSA). Par analogie au complexe MS-325, Aime et coll. et Caravan *et al.* ont utilisé respectivement les groupements benzyloxyméthyle (BOM)⁷⁶ et diphenylcyclohexyl-phosphate (di-PhEDTA)⁷⁷ (figure 1.24). Dans les deux cas, une

Introduction générale

amélioration significative de la relaxivité est observée en présence de la HSA, résultant du ralentissement de la rotation du complexe lié à la protéine.

Dans le but d'augmenter la lipophilie afin de développer une sonde hépatobiliaire, Chang et coll. ont introduit un groupement benzothiazole aniline (BTA)⁷⁸ ou éthoxybenzyle (EOB)⁷⁹ au squelette de l'EDTA. La valeur de $\log P$ passe de -2,72 pour $[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$ à -2,33 pour $[\text{Mn}(\text{EOB-EDTA})]^{2-}$ et -1,34 pour $[\text{Mn}(\text{BTA-EDTA})]^{2-}$. Les complexes ont une affinité modérée à la HSA ($K_a = 95$ et 655 M^{-1} , respectivement pour le dérivé BTA et EOB), et une relaxivité qui augmente de 3,5 à $15,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour $[\text{Mn}(\text{BTA-EDTA})]^{2-}$ et de 2,30 à $6,30 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour $[\text{Mn}(\text{EOB-EDTA})]^{2-}$, en présence de 0,67 mM de HSA (64 MHz, 24 °C).

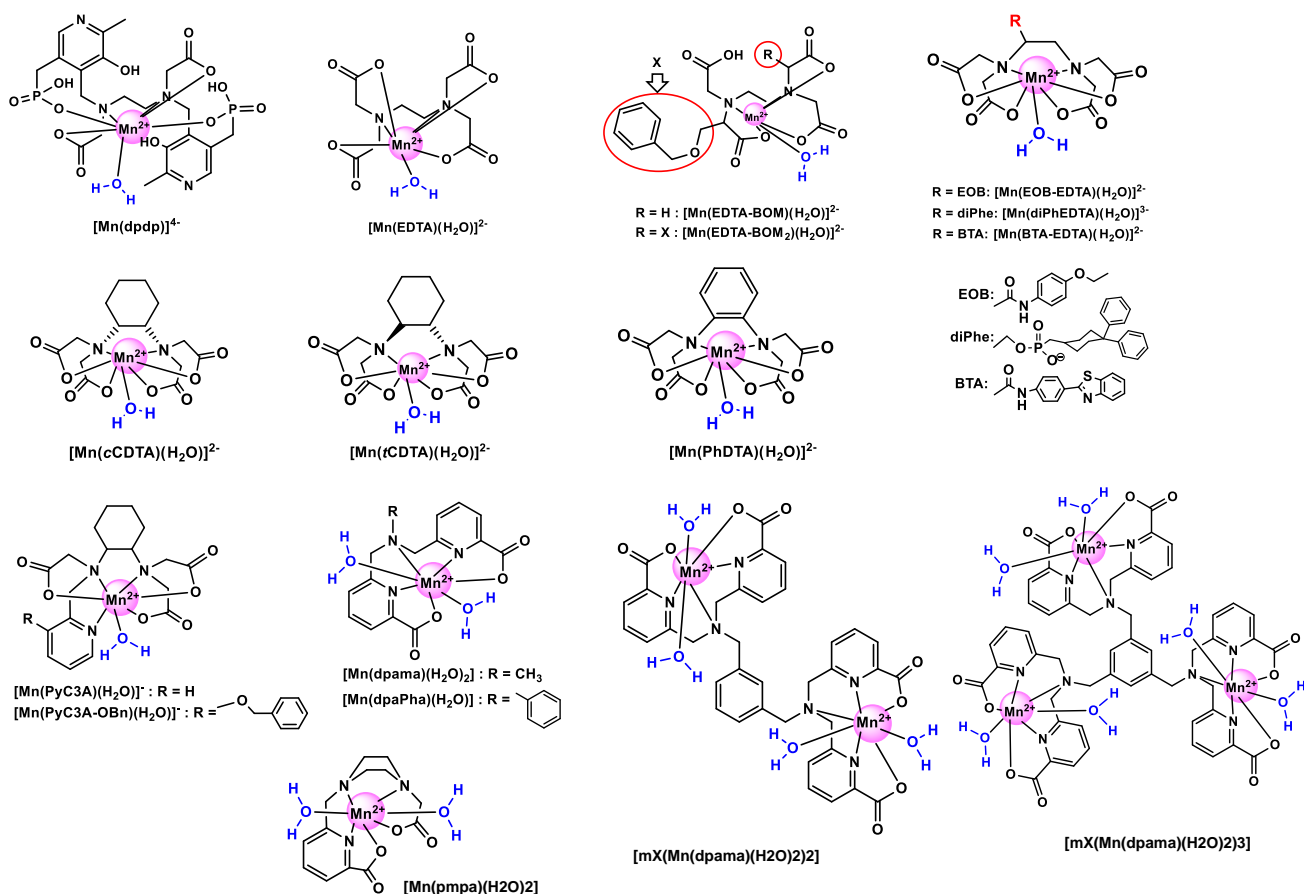


Figure 1.24 : Complexes de Mn^{2+} basés sur des ligands linéaires.

Le tableau 1.2 ci-dessous représente la relaxivité de quelques complexes étudiés et les paramètres qui la gouvernent.

Tableau 1.2 : Nombre de coordination (NC) et d'hydratation (q), vitesse d'échange de la molécule d'eau (k_{ex}^{298}), temps de corrélation rotationnelle (τ_{rH}^{298}) et relaxivité longitudinale (r_1) des complexes de Mn^{2+} .

	NC / q	$k_{ex}^{298} \times 10^6$ (s ⁻¹)	τ_{rH}^{298} (ps)	r_1 (mM ⁻¹ .s ⁻¹) 20 MHz, 25°C
ligands linéaires				
EDTA ⁷⁷	7 / 1	440	57	3,00
tCDTA	7 / 1	140	74	3,62
cCDTA ⁸⁰	7 / 1	225	-	3,79
PhDTA	7 / 1	350	-	3,72
EDTA-BOM ⁷⁶	7 / 1	93	84	3,60
EDTA-BOM₂ ⁷⁶	7 / 1	130	111	4,30
diPhEDTA ⁷⁷	7 / 1	230	-	5,8 (37°C)
PyC3A ⁸¹	7 / 1	100 (310K)	-	3,30
dpama ⁸²	7 / 2	306	48	5,3
mX(dpama)₂ ⁸²	7 / 2	306	96	8,6
mX(dpama)₃ ⁸²	7 / 2	306	136	11,4
ligands macrocycliques				
ENOTA ⁸³	6 / 1	55	85	3,39
BzNO₂A ⁸⁴	6 / 1	44	53	3,40
MeBzNO₂A ⁸⁴	6 / 1	26	67	3,50
NOTA-EB ⁸⁵	7(?) / 1	-	-	4,78 (300 MHz, 37°C)
1,4-DO₂A ⁴³	6-7 / 0,87	1134	46	2,1
1,7-DO₂A ⁴³	6 / 0	-	-	1,5
DO₁A ⁴³	6 / 1	5957	22	2,4
PC₂A ⁸⁶	7 / 1	152	-	-
PC₂A-EA ⁸⁶	7 / 1	40	-	3,52
PC₁A ⁸⁷	6 / 1	3030	23	2,39
PC₁P ⁸⁷	6 / 1	1770	39	2,84
15-pyN₅ ⁸⁸	7 / 2	6,9	-	3,56
15-pyN₃O₂ ⁸⁸	7 / 2	3,8	-	4,48
9-aneN₂O-2A ⁸⁹	6-7 / 1,46	1,19×10 ³	-	2,83
9-aneN₂O-2P ⁸⁹	6 / 1	12,0	-	5,08
autres ligands				
AAZTA ⁹⁰	7 / 0	-	-	1,57
AAZ₃A ⁹⁰	6-7 / 0,64	47	50	2,49
MeAAZ₃A ⁹⁰	6-7 / 0,32	126	50	2,01
AAZ₃MA ⁹⁰	6-7 / 0,24	133	51	1,90

Introduction générale

4.1.2. Ligands linéaires rigides

Afin d'améliorer l'inertie des complexes de Mn^{2+} à base de ligands linéaires, le pont éthylènediamine de l'EDTA a été remplacé par des groupements moins flexibles, tel qu'un diaminocyclohexane, un benzène ou un cycle pyridine.

Une étude de comparaison des isomères *cis* et *trans* du complexe $[Mn(CDTA)]^{2-}$ (figure 1.24) a été menée par Tircsó et coll.⁸⁰ L'isomère *trans*, qui est caractérisé par une distance maximale de 4 Å entre les deux atomes *N*-donneur par rapport à 3,1 Å pour le *cis*, a une inertie cinétique 250 fois plus élevée et une stabilité conditionnelle supérieure ($pMn = 8,68$ pour $[Mn(tCDTA)]^{2-}$ vs. $pMn = 7,82$ pour $[Mn(cCDTA)]^{2-}$, $c_{MnL} = 10 \mu M$; pH 7,4).

Alors que les relaxivités sont similaires, l'échange d'eau est plus rapide d'environ 60 % pour l'isomère $[Mn(cCDTA)]^{2-}$, probablement dû aux contraintes stériques au sein de la sphère de coordination, qui accélère l'étape de la dissociation corrélée au mécanisme dissociatif.

Un dérivé bifonctionnel du $[Mn(tCDTA)]^{2-}$ permettant un ciblage biologique a aussi été étudié.⁹¹

Dans le cas du ligand PhDTA, le squelette est rigidifié avec un cycle aromatique (figure 1.24). La stabilité conditionnelle ($pMn = 8,16$) et la relaxivité ($3,72 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; 20 MHz ; 25°C) du complexe Mn^{2+} sont comparables à celles du $[Mn(tCDTA)]^{2-}$, mais son inertie cinétique est légèrement plus élevée avec un temps de demi-vie de dissociation estimée à 19 h à pH 7,4.⁹²

Un cycle pyridine a aussi été incorporé dans le squelette de l'EDTA et son complexe de Mn^{2+} a été étudié.⁹³

Jusqu'ici, le complexe dont les études ont été menées le plus loin pour des applications en tant qu'agent de contraste IRM est le $[Mn(PyC3A)]^-$. Le ligand PyC3A, développé par le groupe du Dr. Peter Caravan, résulte de l'incorporation d'un groupement pyridine sur le *t*CDTA (figure 1.24), toujours dans le but de rigidifier le chélatant pour une meilleure inertie. Ce complexe monohydraté, qui a une bonne stabilité, est proposé comme une alternative aux agents de contraste à base de Gd^3 extracellulaire.⁸¹ Des études *in vivo* chez la souris ont montré une excrétion du complexe, sans dégradation, par voie rénale mais aussi biliaire, due à son caractère légèrement lipophile. La capacité du $[Mn(PyC3A)]^-$ à améliorer le contraste *in vivo* sur les images IRM pondérées en T_1 a été similaire à celle du $[Gd(DTPA)]^{2-}$.⁹⁴

En plus, $[\text{Mn}(\text{PyC3A})]^-$ est 20 fois plus inerte que ce dernier, utilisé depuis longtemps en clinique. Quand $[\text{Mn}(\text{PyC3A})]^-$ et $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$ sont injectés à dose égale chez des souris, moins de Mn^{2+} est retenu dans l'organisme par rapport au Gd^{3+} .⁹⁵

Un dérivé, le $[\text{Mn}(\text{PyC3A-OBn})]^-$ a été développé pour l'imagerie du foie. Ce composé possède une bonne relaxivité et une clairance sanguine rapide ; il a permis de visualiser des tumeurs hépatiques dans un modèle animal murin.⁹⁶

4.1.3. Dérivés picolines

Botta, Plas-Iglesias *et al.* ont développé une série de ligands dont l'unité complexante pentadentée est l'acide 6,6'-((méthylazanediyl)bis(méthylène)) dipicolinique et qui forment des complexes mono- (H_2dpama , H_2dpaPha), di- ($\text{mX}(\text{H}_2\text{dpaPha})_2$) et tri-nucléaires ($\text{mX}(\text{H}_2\text{dpaPha})_3$) avec le Mn^{2+} (figure 1.24).^{82, 97}

Chaque unité $\text{Mn}(\text{L})$ est dihydratée. Les relaxivités des complexes $\text{Mn}(\text{dpaPha})$ et $\text{Mn}(\text{dpama})$ sont comparables à ceux des complexes de Gd^{3+} dihydratés. Ces exemples démontrent qu'il peut être possible de compenser la baisse de relaxivité due au moment magnétique inférieur du Mn^{2+} par une distance $\text{Mn-H}(\text{H}_2\text{O})$ qui peut être plus courte par rapport à la distance $\text{Gd-H}(\text{H}_2\text{O})$. La liaison du complexe mononucléaire $\text{Mn}(\text{dpama})$ à la HSA a pour conséquence la substitution des deux molécules d'eau de la première sphère par des atomes coordinants de la protéine, en conséquence cela engendre une baisse de la relaxivité. Cependant, pour les complexes bi- et tri-nucléaire, une seule unité $\text{Mn}(\text{dpama})$ est impliquée dans la liaison à la HSA et leur relaxivité reste élevée, de l'ordre de $40 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 20 MHz ; 37°C.

Le complexe $\text{Mn}(\text{pmpa})$ est un autre dérivé picolinate (figure 1.24). Ce dernier est en géométrie bipyramide pentagonale, les positions axiales sont occupées par des molécules d'eau et le plan équatorial par les groupements donneurs du ligand. La stabilité est relativement élevée pour un complexe dihydraté avec $\log K_{\text{MnL}} = 14,3$ et $\text{pMn} = 8,06$ ($c_{\text{MnL}} = 10 \mu\text{M}$; pH 7,4). La relaxivité assez importante ($5,88 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; 60 MHz ; 25°C)⁹⁸ est la conséquence des deux molécules d'eau au sein de la première sphère de coordination.

4.2. Complexes de Mn²⁺ basés sur des macrocycles

4.2.1. Macrocycles à 9 chaînons

Au sein de la famille des triazacyclononanes, il a été établi très tôt que le triacétate NOTA forme un complexe [Mn(NOTA)]⁻ non hydraté, avec une faible relaxivité.⁹⁹

Par conséquent, différents dérivés comportant moins de sites coordinants ont été conçus afin d'obtenir des complexes de Mn²⁺ hydratés. Le dimère ENOTA en était le premier exemple,⁸³ résultant du remplacement d'un groupement acétate par un diéthylène qui joue le rôle de connecteur entre les deux unités complexantes, suivi par d'autres monomères, dimères ou macromolécules^{84, 100-101} (figure 1.25). Comme attendu, le complexe Mn₂(ENOTA) est hexacoordiné avec cinq donneurs du ligand et une molécule d'eau dans la première sphère.

L'échange de la molécule d'eau est deux fois plus rapide que celui de l'aqua ion. Le volume d'activation négatif ($\Delta V^\ddagger = -10,7$ contre $-5,4 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ pour l'aqua ion) témoigne d'un mécanisme d'échange fortement associatif.

Par le biais d'une étude RMN de l'¹⁷O, NMRD et DFT sur les dérivés du NO₂A (MeNO₂A, BzNO₂A, MeBzNO₂A et mBz(NO₂A)₂ ; figure 1.25), Platas-Iglesias et coll. ont démontré que l'encombrement stérique induit par le groupement non coordinant introduit sur un azote du macrocycle a une grande influence sur la vitesse d'échange de la molécule d'eau.⁸⁴ En effet, un groupement encombrant limite l'approche de la molécule d'eau entrante et conduit à un ralentissement de l'échange ; le k_{ex} ²⁹⁸ diminue d'un ordre de grandeur quand le méthyle est substitué par un benzyle sur le NO₂A. Les groupements encombrants limitent même le nombre de molécules d'eau au niveau de la première sphère, comme en témoigne le complexe [Mn(mBz(NO₂A)₂)], pour lequel $q = 0,5$, indiquant la présence en équilibre d'un complexe hydraté et d'un autre non hydraté.

Le NO₂A-monoamide a été conjugué à du Bleu Evans (BE) pour favoriser la liaison du complexe à la HSA. Ce complexe de Mn²⁺ a été évalué comme agent bimodale T_1 et T_2 pour la visualisation de tumeurs cérébrales sous-cutanés et orthotopiques chez la souris.⁸⁵

Platas-Iglesias et coll. ont ajouté une fonction picolinate sur un azote du macrocycle triazacyclononane pour obtenir le ligand nompa (figure 1.25). Le complexe [Mn(nompa)]⁺ est monohydraté, mais son inertie n'est pas satisfaisante pour une application *in vivo*.¹⁰²

Dans une autre approche, Drahos et coll. ont remplacé un azote du macrocycle par un oxygène et ont étudié les complexes de Mn^{2+} formés avec des ligands portant des groupements acétate, phosphonate, phosphinate ou phénylphosphinate (figure 1.25).⁸⁹ Malheureusement, leur dissociation à pH 6 et en présence de 5 équivalents de Zn^{2+} est instantanée, limitant leur candidature comme agent de contraste en IRM.

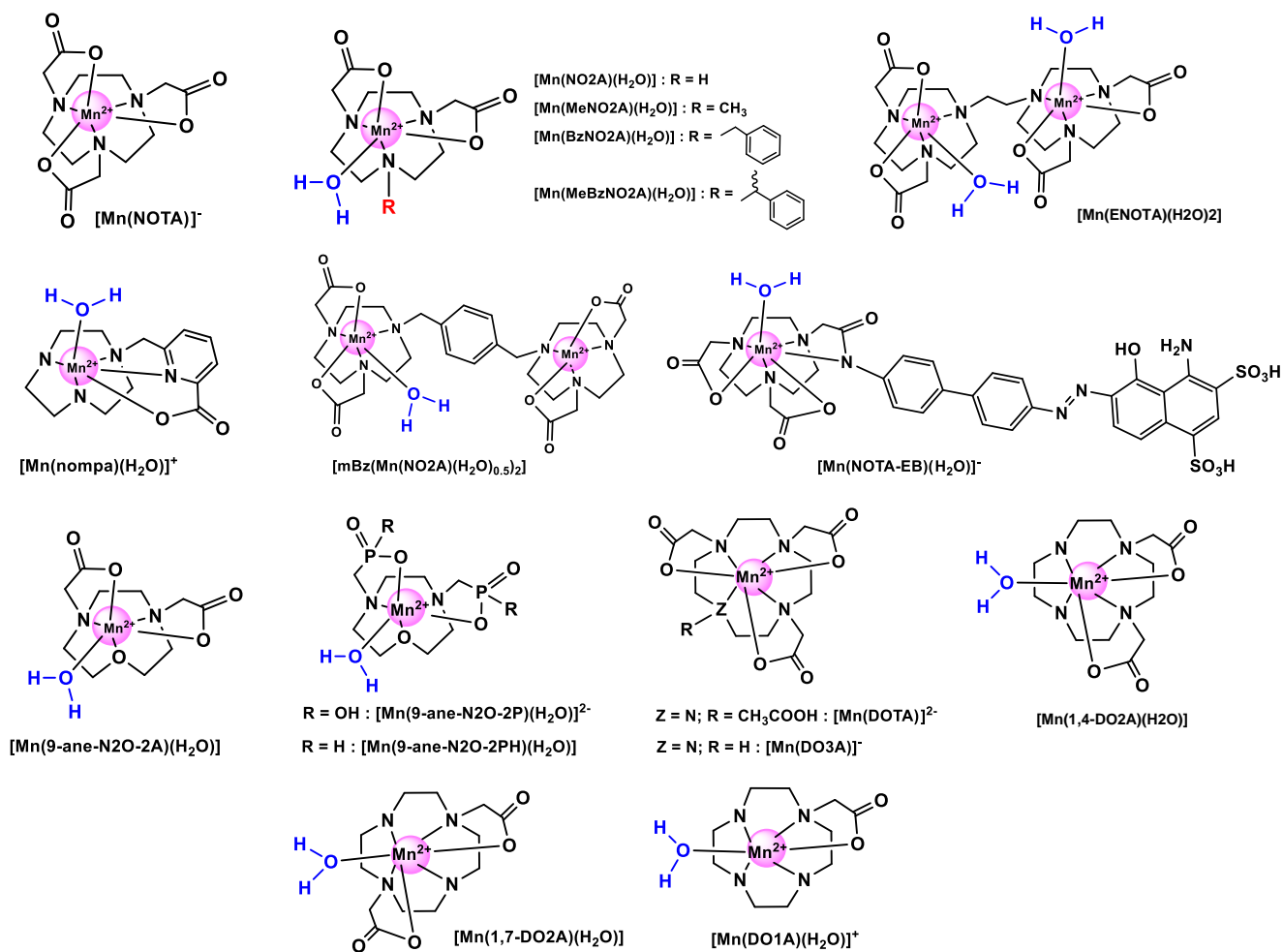


Figure 1.25 : Complexes de Mn^{2+} basés sur des macrocycles à 9 ou 12 chaînons.

4.2.2. Macrocyclus à 12 chaînons

Parmi les ligands à base de cyclène, le DOTA forme un complexe $[Mn(DOTA)]^{2-}$ très stable et inerte.¹⁰³ Cependant, les complexes $[Mn(DOTA)]^{2-}$, $[Mn(DO_3A)]^-$ ou leurs dérivés ne contiennent pas de molécules d'eau au sein de leur première sphère de coordination.^{43, 104}

Introduction générale

L'état d'hydratation et les propriétés d'échange des molécules d'eau ont été évalués pour les deux isomères diacétate, le [*trans*-Mn(1,7-DO2A)] et le [*cis*-Mn(1,4-DO2A)], ainsi que pour le monoacétate [Mn(DO1A)]⁺ (figure 1.25), par une étude combinant RMN de l'¹⁷O, NMRD et DFT.⁴³ Alors que le complexe [Mn(DO1A)]⁺ est monohydraté, des espèces monohydratées et non-hydratées co-existent en solution pour les complexes des isomères DO2A, avec en moyenne $q = 0,9$ pour [Mn(1,4-DO2A)] et proche de 0 pour [Mn(1,7-DO2A)].

Leur relaxivité est cohérente avec leur état d'hydratation : $r_1 = 1,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $2,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, respectivement, pour [Mn(1,7-DO2A)] et [Mn(1,4-DO2A)] à 30 MHz ; 25°C. La stabilité de [Mn(1,4-DO2A)] est légèrement supérieure ($\text{pMn} = 7,27$ pour [Mn(1,4-DO2A)] et $\text{pMn} = 6,25$ pour [Mn(1,7-DO2A)], $c_{\text{MnL}} = 10 \text{ } \mu\text{M}$; pH 7,4). Leur inertie est similaire, avec des temps de demi-vie de dissociation estimés à 48 et 57 h, respectivement pour [Mn(1,4-DO2A)] et [Mn(1,7-DO2A)] sous des conditions physiologiques pertinentes.¹⁰⁵ Néanmoins, ils sont environ 20 fois plus labiles que [Mn(DOTA)]²⁻ ($t_{1/2} = 1061 \text{ h}$).⁸⁹

Des chaînes hydrophobes C₁₂ ou C₁₆ ont été ramifiées au niveau des amines secondaires du ligand 1,4-DO2A, permettant la formation de micelles et une liaison à la HSA ; les deux entraînent une augmentation de la relaxivité (~ 6 à 7 fois pour la forme micellaire et ~ 15 fois pour la forme liée à la HSA ; 25 °C ; 30 MHz).¹⁰⁶

L'introduction d'un cycle pyridine au sein des macrocycles à 12 chaînons permet de rigidifier le ligand et ainsi renforcer l'inertie cinétique des complexes. Des complexes de Mn²⁺ portant un groupement acide acétique ou méthylphosphonique ont été étudiés dans un premier temps (figure 1.26).⁸⁷ Ces complexes [Mn(PC1A)]⁺ et [Mn(PC1P)] sont hexa-coordinés, avec une molécule d'eau au sein de la première sphère de coordination. Leur stabilité, ainsi que leur inertie restent modestes.

Par contre, les complexes formés par le ligand PC2A, contenant deux groupements acétate au niveau des deux azotes opposés, et le dérivé PC2A-EA (figure 1.26) ont une excellente stabilité et une bonne inertie. La valeur de pMn ne diminue que légèrement en passant du triacétate [Mn(PCTA)]⁻ à [Mn(PC2A-EA)]⁺ et [Mn(PC2A)] (respectivement 9,74 ; 9,27 et 8,64 à pH 7,4 ; 10 μM MnL). Le complexe [Mn(PC2A-EA)]⁺ (à pH 6, l'amine est protonée) est 120 fois plus inerte que Mn(PyC3A).⁸⁶

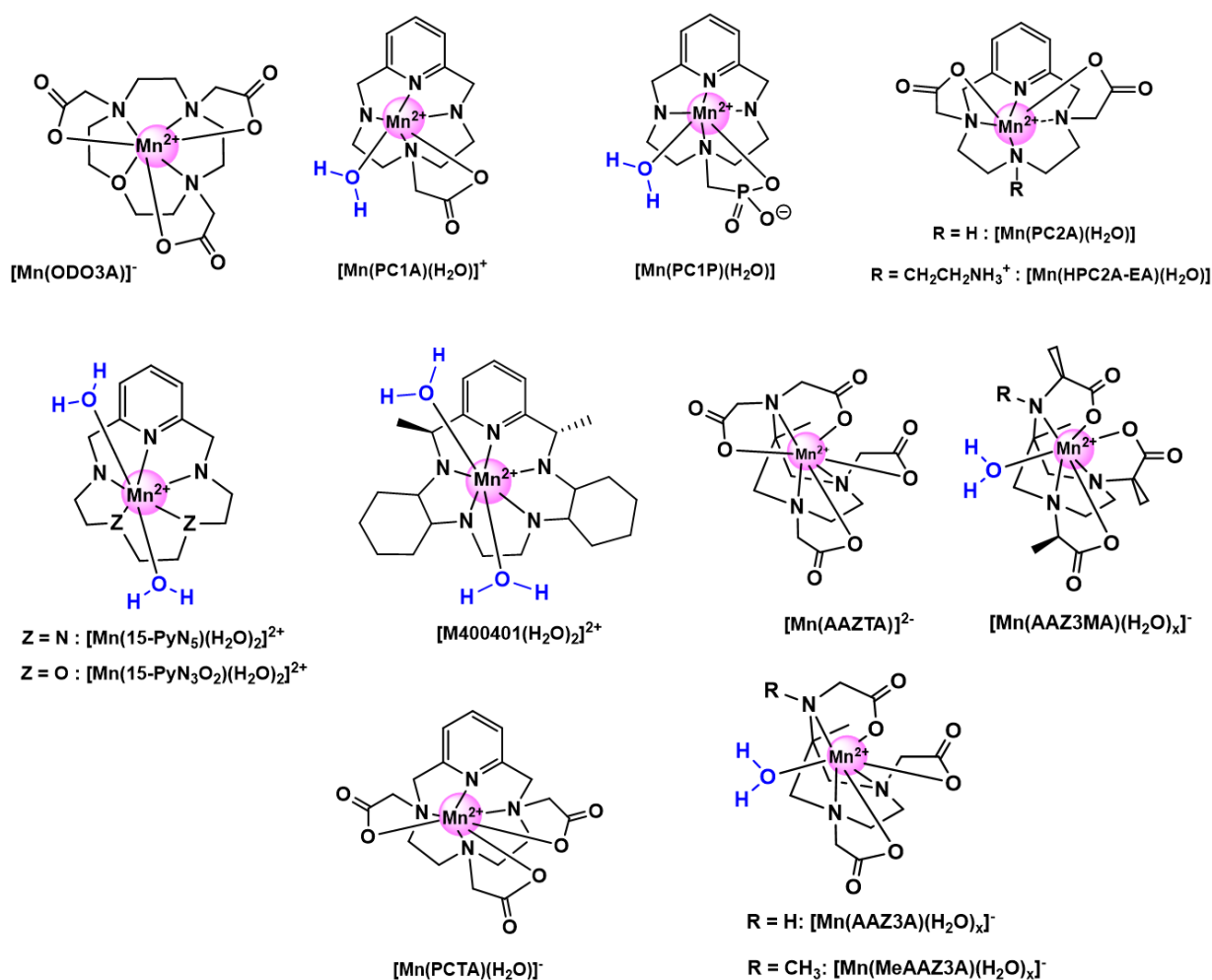


Figure 1.26 : Complexes Mn^{2+} basés sur des macrocycles à 12 chaînons, plus larges ou d'autres types de ligands.

4.2.3. Macrocyclus plus grands

De nombreux aza ou aza-oxa éthers couronnes ont été étudiés pour la complexation du Mn^{2+} , afin d'explorer plus particulièrement leur activité superoxyde dismutase (SOD).¹⁰⁷ D'une manière générale, dans ces structures les atomes donneurs du macrocycle occupent le plan équatorial et les molécules d'eau se positionnent axialement dans une géométrie pentagonale bipyramidale. Les 15-pyN₃O₂ et 15-pyN₅, macrocycles à 15 chaînons, renferment un cycle pyridine (figure 1.26).⁸⁸ Il est intéressant de noter que l'échange d'eau est particulièrement lent pour le complexe $\text{Mn}(15\text{-pyN}_3\text{O}_2)$ ($k_{\text{ex}}^{298} = 3,8 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$), ce qui a été attribué aux liaisons hydrogènes formées entre les molécules d'eau coordonnées et les oxygènes de l'hétéro-macrocycle.

Introduction générale

Bogdanov et coll. ont utilisé le complexe Mn(M400401) ; figure 1.26) comme agent théranostique en combinant l'IRM et l'activité superoxyde dismutase. Encapsulé dans un liposome, il franchit la barrière hémato encéphalique (BHE) et a été proposé comme agent de traçage IRM et neuroprotecteur pour lutter contre les superoxydes produits durant l'ischémie.¹⁰⁸

4.3. Complexes de Mn²⁺ basés sur d'autres types de ligands

Des ligands de type AAZTA basés sur la 6-amino-6-méthylperhydro-1,4-diazépine et possédant des groupements carboxylates ont été développés par Botta et coll. (figure 1.26).⁹⁰ En solution, les complexes [Mn(AAZ3A)]⁻, [Mn(MeAAZ3A)]⁻ et [Mn(AAZ3MA)]⁻ existent en équilibre d'hydratation entre une forme monohydratée et une forme non hydratée, avec un nombre d'hydratation q moyenne de 0,64 ; 0,32 et 0,24, respectivement, déterminé par RMN de l'¹⁷O. Leur relaxivité (2,49 ; 2,01 et 1,90 mM⁻¹.s⁻¹ à 20 MHz ; 25 °C) est conforme à un état partiellement hydraté. Le complexe [Mn(AAZTA)]²⁻ n'a pas de molécule d'eau en première sphère de coordination.

4.4. Inertie cinétique et stabilité thermodynamique

Le Mn²⁺ est un cation labile et la conception d'un complexe de Mn²⁺ hautement inerte, comparable à l'agent de contraste [Gd(DOTA)]⁻, par exemple, reste un challenge en chimie de coordination.

Pour évaluer l'inertie, généralement, on réalise des réactions de transmétallation avec des métaux divalents comme le Zn²⁺ ou le Cu²⁺ dans des conditions de pseudo-premier ordre à différents pH. De façon générale, le mécanisme de dissociation des complexes de Mn²⁺ est similaire à celui des complexes de Gd³⁺ : la décomplexation peut se faire par (i) voie spontanée, (ii) catalyse acide, ou (iii) assistance d'un cation métallique.

La première étude de cinétique de dissociation détaillée a été réalisée sur les complexes [Mn(NOTA)]⁻ et [Mn(DOTA)]⁻ non hydratés, montrant une décomplexation proton-assistée.⁸⁹ Dans une étude comparative sur les complexes de Mn²⁺ dérivés d'EDTA et d'AAZTA, Kálmán et Tircsó ont mis en évidence la très bonne inertie du complexe [Mn(*t*CDTA)]²⁻, avec un temps de demi-vie de dissociation de 12 h (pH 7,4 ; 10 μM Cu²⁺).¹⁰⁹ Cette bonne inertie a été liée à la

Chapitre 1

structure rigide du CDTA par rapport à l'EDTA, offrant une cavité de coordination pré-organisée. En revanche, le $[\text{Mn}(\text{DTPA})]^{3-}$, pourtant non hydraté, a une dissociation instantanée dans les mêmes conditions. La cause probable de ce phénomène est la haute basicité de l'amine centrale et la présence d'atomes donneurs non coordonnés qui peuvent favoriser la formation d'intermédiaires protonés et dinucléaires contribuant à la dissociation.

Récemment, une étude très complète a été réalisée sur une série de complexes de Mn^{2+} formés avec des ligands macrocycliques afin d'établir des relations entre la rigidité du ligand, la nature des atomes donneurs dans le macrocycle (pyridine N, amine N, éther O) et au niveau des substituants (carboxylate, phosphonate, amide primaire, secondaire et tertiaire) et la stabilité ou l'inertie des complexes de Mn^{2+} .¹¹⁰ Bien que la plupart de ces complexes ne soient pas hydratés, cette étude a mis clairement en évidence des liens entre structure et stabilité.

La diminution du nombre de coordination et de la basicité du DOTA en éliminant les carboxylates entraîne une diminution de la stabilité, qui peut être néanmoins compensée partiellement par l'incorporation d'une pyridine (PCTA) ou d'une fonction éther (ODO3A) dans le macrocycle (figure 1.26). Les ligands avec des fonctions amide forment des complexes moins stables que leurs analogues carboxylates, et la stabilité est plus diminuée pour les amides primaires que pour les amides secondaires et tertiaires. Par contre, ces dérivés amide ont une inertie plus élevée par rapport à celle des acétates, en conséquence de l'absence des fonctions facilement protonables, réduisant ainsi la contribution du mécanisme de dissociation proton-assisté.

La même tendance a également été observée en comparant le $[\text{Mn}(1,4\text{-DO2A})]$ et son dérivé de bisméthylamide.⁴⁴

De façon générale, toutes ces études mettent en évidence l'importance de la rigidité du ligand et de la présence d'une « cavité ou cage » pour concevoir des complexes de Mn^{2+} inertes.

Le tableau 1.3 ci-dessous représente les constantes de stabilité et des temps de demi-vie de quelques complexes étudiés dans cette partie.

Introduction générale

Tableau 1.3 : Constantes de stabilité thermodynamique, $\log K_{ML}$, pMn ($c_{Mn} = c_L = 10^{-5} M$, $pH 7.4$) et $t_{1/2}$ (estimé à $pH 7,4$; avec $10^{-5} M Zn^{2+}$ ou $10^{-6} M Cu^{2+}$) de la dissociation de quelques complexes de Mn^{2+} .

	NC / q	$\log K_{ML}$	pMn	$t_{1/2}$ (h)
ligands linéaires				
EDTA ¹⁰⁹	7 / 1	12,46 ^a	7,83 ^a	0,076
tCDTA	7 / 1	14,32 ^a	8,68 ^a	12
cCDTA ⁸⁰	7 / 1	14,19 ^a	7,82 ^a	0,47
PhDTA ⁹²	7 / 1	11,79 ^a	8,38 ^a	19,1
EDTA-BOM ⁷⁶	7 / 1	13,50 ^b	7,82 ^b	-
EDTA-BOM₂ ⁷⁶	7 / 1	13,80 ^b	8,12 ^b	-
PyC3A ⁸¹	7 / 1	14,14 ^a	8,17 ^a	0,285 ^c
ligands macrocycliques				
NOTA ¹⁰¹	6 / 0	14,90	11,80	74 ⁸⁹
ENOTA ⁸³	6 / 1	24,06 (pour Mn_2L)	-	-
DOTA ¹¹¹	6 / 0	19,44	9,02	1037 ⁸⁹
DO3A ¹¹⁰	6 / 0	16,55	8,66	11000
ODO3A ¹¹⁰	6 / 0	13,88	8,57	180
1,4DO2A ¹⁰⁵	6-7 / 0,87	15,68	7,27	48,3
1,7DO2A ¹⁰⁵	6 / 0	14,64	6,52	56,8
PC2A ⁸⁶	7 / 1	17,09	8,64	-
PC2A-EA ⁸⁶	7 / 1	19,01	9,27	54,4 ^c
PC1A ⁸⁷	6 / 1	11,54 ^d	-	-
PC1P ⁸⁷	6 / 1	14,06 ^d	-	2,4
15-pyN₅ ⁸⁸	7 / 2	10,89 ^d	6,37 ^d	11,40
15-pyN₃O₂ ⁸⁸	7 / 2	14,06 ^d	6,19 ^d	-
9-aneN₂O-2A ⁸⁹	6-7 / 1,46	7,43 ^d	5,23 ^d	-
9-aneN₂O-2P ⁸⁹	6 / 1	10,61 ^d	5,06 ^d	-
autres ligands				
AAZTA ⁹⁰	7 / 0	14,19	8,15	-
AAZ3A ⁹⁰	6-7 / 0,64	11,00	6,58	0,7 ¹⁰⁹
MeAAZ3A ⁹⁰	6-7 / 0,32	11,43	6,47	-
AAZ3MA ⁹⁰	6-7 / 0,24	10,67	6,39	-

^a 0.1 M NaCl / 25 °C ; ^b 0.1 M KCl / 20 °C ; ^c pH 6 / 37 °C / 25 equ Zn^{2+} ; ^a 0.1 M $(CH_3)_4NCl$ / 25 °C.

4.5. Complexes de Mn^{2+} responsifs

Une particularité de l'IRM, contrairement aux modalités d'imagerie nucléaire, est que l'efficacité d'un agent de contraste, donc le signal IRM détecté, peut être rendu dépendant de la présence des biomarqueurs ou des paramètres physico-chimiques du tissu. Les changements de certains de ces paramètres *in vivo*, tels que la surexpression d'une protéine spécifique, la variation de l'état redox ou du pH sont intrinsèquement liés à des maladies et peuvent être utilisés pour un diagnostic précoce.

De ce fait, une nouvelle classe de sondes IRM, à savoir les agents de contraste responsifs ou « intelligents » voit le jour, mais leur application *in vivo* reste encore très limitée et aucune de ces sondes n'est entrée en utilisation clinique.^{36, 112-116}

Depuis quelques années, de plus en plus de complexes de manganèse sont proposés en tant qu'agents de contraste intelligents, dont nous allons présenter quelques exemples ici. En plus des mécanismes classiques pour moduler la relaxivité d'un complexe paramagnétique via l'interaction avec un biomarqueur (changement dans le nombre d'hydratation, de la dynamique de rotation), la capacité redox du manganèse offre des possibilités supplémentaires, en particulier pour concevoir des agents de contraste sensibles à l'état redox.

Introduction générale

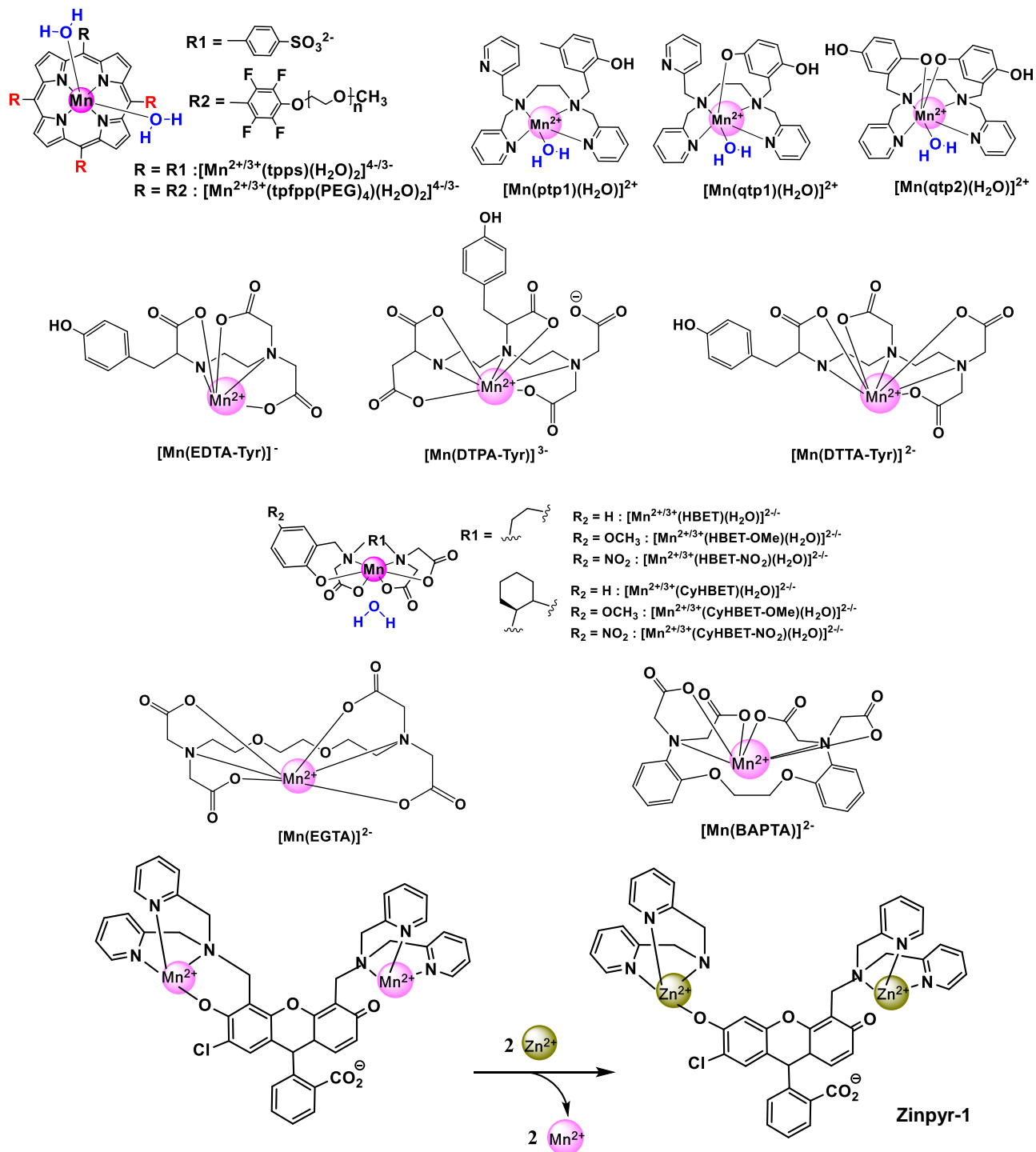


Figure 1.27 : Exemples de complexes Mn^{2+} responsifs.

4.5.1. Sondes sensibles à l'état redox basées sur le couple Mn^{3+}/Mn^{2+}

L'état redox tissulaire est un biomarqueur important. Une régulation très stricte de l'état redox du milieu intra- et extracellulaire est primordiale pour le bon fonctionnement de l'organisme. La modification de l'état redox est liée au stress cellulaire biotique ou abiotique, principalement associée à la génération d'espèces réactives à l'oxygène (ROS), ayant pour conséquence le stress oxydant. Les principaux acteurs moléculaires de l'homéostasie redox sont la cystéine, le glutathion, le peroxyde d'hydrogène, ou la nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) ; leur concentration et potentiel redox varient en fonction de l'état physiologique (par exemple, prolifération, apoptose) et/ou pathologique de la cellule. Ce sont des biomarqueurs optimaux.¹¹⁷⁻¹¹⁸

Le Mn^{2+} et le Mn^{3+} sont tous les deux paramagnétiques mais avec des mécanismes de relaxation différents, et par conséquent pour un même ligand donné, les complexes de Mn^{2+} et de Mn^{3+} peuvent avoir des relaxivités très différentes.

La première sonde à base de Mn(porphyrine) sensible à la réaction d'oxydoréduction a été développée par Aime et coll.¹¹⁹ Leur objectif était de suivre la pression partielle d'oxygène $p(O_2)$, dans des conditions pathologiques pertinentes pour obtenir des sondes qui permettent une bonne différenciation du taux sanguin au niveau artériel et veineux par IRM. La porphyrine tpps (figure 1.27) forme des complexes stables à la fois avec Mn^{2+} et Mn^{3+} . Les complexes $[Mn(tpps)]^{4+}$ et $[Mn(tpps)]^{3+}$ ont une grande différence de relaxivité, mais uniquement à bas champs (~ 21 et $\sim 6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ respectivement pour $[Mn(tpps)]^{4+}$ et $[Mn(tpps)]^{3+}$; 0,1 MHz ; 25 °C).

Aux champs magnétiques utilisés en clinique (1,5 à 3 T), cette différence chute drastiquement. Afin d'assurer une différence détectable à ces champs, le complexe a été incorporé dans une poly- β -cyclodextrine de poids moléculaire 6 kD. Comme la relaxivité de la forme réduite Mn^{2+} est contrôlée par la rotation, dans cette structure macromoléculaire elle augmente fortement, mais pas pour la forme oxydée (Mn^{3+}), dont la relaxivité est gouvernée par la relaxation électronique. Exposé à différents taux d'oxygène, le complexe $[Mn(tpps)]^{4+}$ subit une oxydation complète à 40 mmHg O_2 , avec des relaxivités proportionnelles au pO_2 .

Tóth, Geraldés et coll. ont développé des complexes à base de porphyrines plus solubles et stables, ce qui serait très important pour des applications *in vivo*.¹²⁰ Ils ont proposé une porphyrine fluorée plus biocompatible et hydrosoluble conjuguée à des chaînes polyéthylène

Introduction générale

glycol (PEG), le tpfpp(PEG)₄ (figure 1.27). Le complexe formé avec le Mn³⁺ a une cinétique de réduction rapide et de ré-oxydation lente. Les relaxivités sont respectivement ~ 24 et ~ 10 mM⁻¹.s⁻¹ pour [Mn(tpfpp)(PEG)₄] et [Mn(tpfpp)(PEG)₄]⁺ à 20 MHz, 25 °C.

Caravan et coll. ont développé une nouvelle famille basée sur des dérivés EDTA et CDTA (HBET et CyHBET respectivement) fonctionnalisés avec des groupements phénolates (figure 1.27).¹²¹ Ces dérivés forment des complexes de Mn²⁺ plus inertes que ceux à base d'EDTA et CDTA. Cependant, on n'observe pas une augmentation significative de leur stabilité. La relaxivité des complexes de Mn²⁺ est plus élevée que celle à base de Mn³⁺ (par exemple pour CyHBET, r_1 est 8,3 fois plus élevée et r_2 6,6 fois). La vitesse de réduction de Mn³⁺ en Mn²⁺ en présence de la L-cystéine dépend de la nature (électro-attracteur / électro-donneur) du substituant en position 5 du groupement phénolate. La réduction est d'un ordre de grandeur plus lente pour les dérivés dont R₂ = H, que pour ceux avec R₂ = NO₂.

4.5.2. Sondes responsives au pH

La plupart des sondes sensibles au pH à base de Mn²⁺ fonctionnent sur le principe du relargage du Mn²⁺ en augmentant l'acidité. Récemment, une sonde prometteuse dont le changement du signal IRM pondéré en T_1 est basé sur la variation du nombre de molécules d'eau au sein de la première sphère de coordination a été développée.⁸⁶ C'est un dérivé du PC2A (PC2A-EA) portant un groupement d'éthylamine, dans lequel la coordination de l'azote de l'amine primaire au Mn²⁺ est sensible à la variation du pH (figure 1.26). Le complexe est stable et possède une très bonne inertie (tableau 1.3). Dans la gamme de pH 3,7 à 5,8, la valeur de r_1 est de 3,5 mM⁻¹.s⁻¹ à 0,49 T, 25 °C, correspondant au complexe monohydraté et protoné au niveau de l'amine primaire. En dessous du pH 3,7, une seconde étape de protonation entraîne la dissociation du complexe et donc l'augmentation de la relaxivité. Au-delà du pH 5,8, on note une diminution de la relaxivité à 2,1 mM⁻¹.s⁻¹ à pH > 8,4 qui reflète la déprotonation et la coordination de l'azote de l'amine primaire au Mn²⁺, accompagnée de la substitution de la molécule d'eau de la première sphère de coordination ($q = 0$). Des fantômes IRM réalisés en pondération T_1 en présence de HSA révèlent une nette variation du signal en fonction du pH, qui devient encore plus importante sur les images pondérées en T_2 (avec une r_2 passant de 1,71 à 8,34 mM⁻¹.s⁻¹ entre pH 7,5 et 6,7).

4.5.3. Sondes responsives à d'autres biomarqueurs

Les complexes de Mn^{2+} ont été utilisés pour la détection de biomarqueurs redox, tels que les espèces réactives à l'oxygène (par exemple, H_2O_2) ou la superoxyde dismutase¹²²⁻¹²⁴; mais également le Zn^{2+} ¹²⁵⁻¹²⁶ et le Ca^{2+} ¹²⁷.

Goldsmith et coll. ont développé trois ligands actifs à l'oxydation en présence de H_2O_2 (figure 1.27) : ptp1¹²² ; qtp1¹²³ obtenu par substitution du méthyle par un hydroxyle en position *para* du quinol du ligand ptp1; qtp2¹²⁴ résultant de la substitution d'une pyridine du ligand qtp1 par un autre groupement hydroquinone. Tandis que l'oxydation de ptp1 conduit à une espèce dinucléaire et à la déprotonation d'au moins de l'un des phénols, pour les deux autres ligands, les groupements quinols sont oxydés en *para*-quinone. En présence de H_2O_2 , on observe alors une augmentation de la relaxivité (de 5,46 à 7,17 $mM^{-1}.s^{-1}$ dans le cas du qtp2 ; 3 T). Les études RPE (résonance paramagnétique électronique) ont montré que l'état d'oxydation du manganèse n'a pas changé, suggérant que la relaxivité augmente grâce à l'enrichissement de la première sphère de coordination en molécules d'eau.

4.6. IRM responsive basée sur le relargage du Mn^{2+}

Des complexes qui relarguent le Mn^{2+} induisant la variation de l'intensité du signal IRM en réponse à un biomarqueur ont été décrits pour détecter l'état redox par le biais de la réduction du Mn^{3+} ¹²⁸, la variation du pH¹²⁹⁻¹³⁰, la présence d'une enzyme¹³¹, la variation de la concentration de Ca^{2+} ¹³² ou de Zn^{2+} ¹³³. Par exemple, Botta et coll. ont développé trois chélatants du Mn^{2+} basés sur des dérivés d'EDTA, DTPA et DTTA, où une aminoacétate est substituée par un résidu L-tyrosine (figure 1.27).¹³¹ Ces sondes sont responsives à la tyrosinase, surexprimée dans les cellules de mélanome (tumeurs malignes du système pigmentaire de la peau : mélanocytes). L'action de l'enzyme déstabilise le complexe et provoque le relargage du Mn^{2+} , qui sera éventuellement capté par des macromolécules biologiques, conduisant ainsi à une augmentation de relaxivité remarquable (350 % pour le dérivé DTTA).

Jasanoff et coll.¹³² ont montré que les complexes $[Mn(EGTA)]^{2-}$, $[Mn(BAPTA)]^{2-}$ (figure 1.27) et $Mn(\text{calmoduline ; protéine chélatant du } Ca^{2+})$, tous labiles et sélectifs au Ca^{2+} favorisent le relargage du Mn^{2+} en présence de Ca^{2+} extracellulaire. Une augmentation du signal IRM pondérée en T_1 (4,7 T) a été observée pour les complexes $[Mn(EGTA)]^{2-}$ (3 fois) et

Introduction générale

$[\text{Mn}(\text{BAPTA})]^{2-}$ (4,7 fois) due à la formation de l'aqua ion $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$. En revanche, pour le Mn(calmoduline), le signal IRM diminue de moitié en présence du Ca^{2+} . Ceci est due à la très haute relaxivité initiale du Mn(calmoduline) grâce à une dynamique de rotation lente et une hydratation élevée.

Une sonde bimodale fluorescence / IRM pour la détection du Zn^{2+} a été développée¹³³, basée sur un complexe dinucléaire de Mn^{2+} avec le fluorophore Zinpyr-1 responsif au Zn^{2+} . Elle est sélective au Zn^{2+} vis-à-vis des autres métaux endogènes. En présence de Zn^{2+} , le signal de fluorescence augmente très fortement (~ 25 fois), alors que la relaxivité r_1 reste pratiquement identique et la r_2 augmente de 70 %.

5. Les Bispidines

Des études ont montré que la rigidification du squelette du ligand pourrait augmenter l'inertie du complexe de Mn^{2+} . La figure 1.28 ci-dessous illustre cette observation.

Dans ce contexte, nous avons exploré une nouvelle famille de chélatants du Mn^{2+} : les bispidines (figure 1.28).

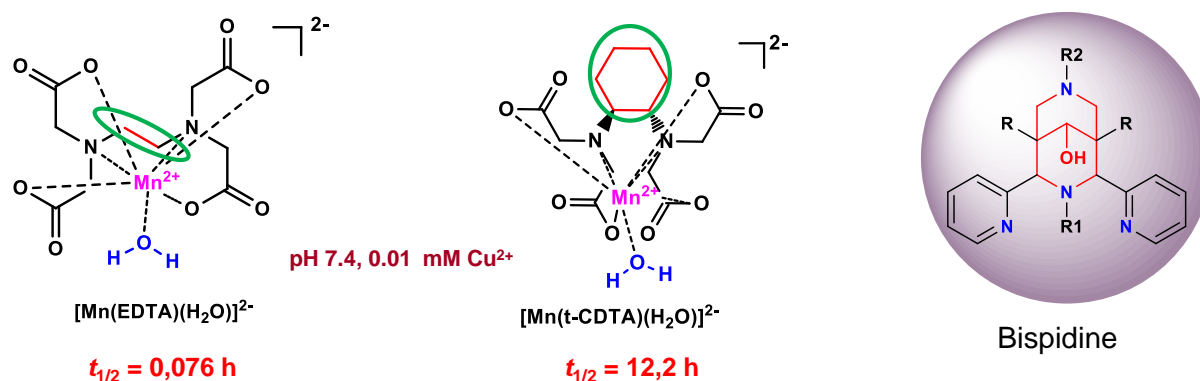


Figure 1.28 : Temps de demi-vie de dissociation de $[Mn(EDTA)]^{2-}$ et $[Mn(tCDTA)]^{2-}$ sous l'effet de la rigidification ; représentation 2D de la structure principale des bispidines étudiées dans cette thèse.

5.1. Généralités

Les bispidines sont des hétérocycles de type bicyclique ponté, correspondant à un diazabicyclononane, renfermant une fonction cétone ou alcool en tête de pont dans la plupart des cas, d'où le nom de bispidone 9-oxo-3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonane avec la présence de la fonction cétone (figure 1.29). Elles ont été découvertes en 1930¹³⁴ par les chimistes allemands Carl Mannich et Paul Mohs.

Les bispidines forment une sous unité que l'on retrouve dans certains produits naturels, tels que la (-)-cytisine, ou la (-)-spartéine¹³⁵ (figure 1.29), un alcaloïde prédominant du *Lupinus mutabilis* et un agent anti-arythmique pour bloquer les canaux de sodium. La spartéine est aussi utilisée comme base chirale en synthèse asymétrique.

Introduction générale

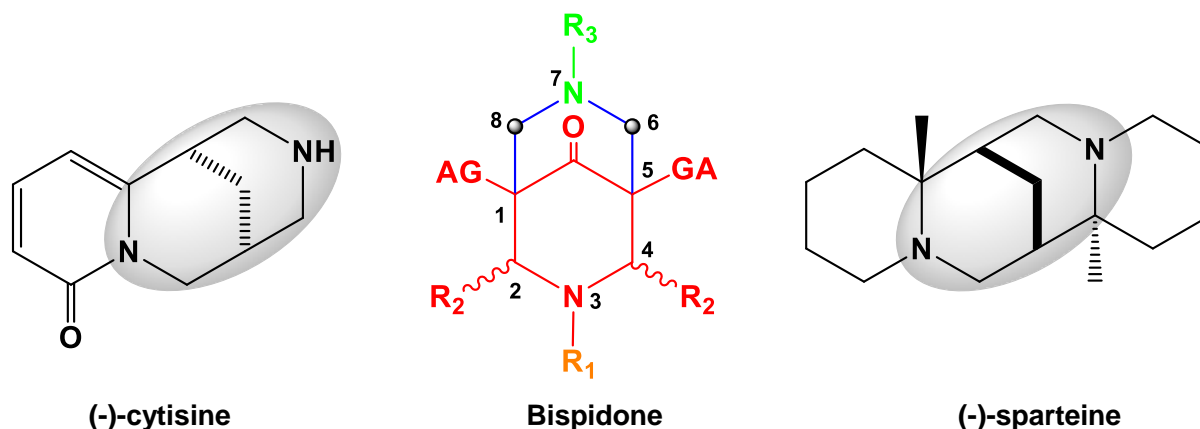


Figure 1.29 : Représentation de la structure de la (-)-cytisine, bispidone et (-)-sparteine.

5.1.1. Synthèse

L'élaboration des bispidines est principalement basée sur une méthodologie de synthèse de type multicomposants (MCR de l'anglais multicomponent reaction) permettant l'obtention d'un édifice chimique complexe en moins d'étapes de synthèse. Il existe une palette de réactions multicomposants ; celle utilisée pour la synthèse des bispidines est de type Mannich (MC-3R), faisant référence au nom du chimiste allemand qui l'a mis en point, mettant en jeu trois réactifs. La synthèse se déroule principalement en deux grandes étapes successives de réactions de double Mannich.¹³⁶ La première donne un précurseur de type pipéridinone, résultant d'une cétone énolisable renfermant des groupements électro-attracteurs en position bêta (β), d'un aldéhyde et d'une amine. La seconde étape met en jeu la pipéridinone, le formaldéhyde et une amine, et conduit à la formation de la bispidone (figure 1.30).

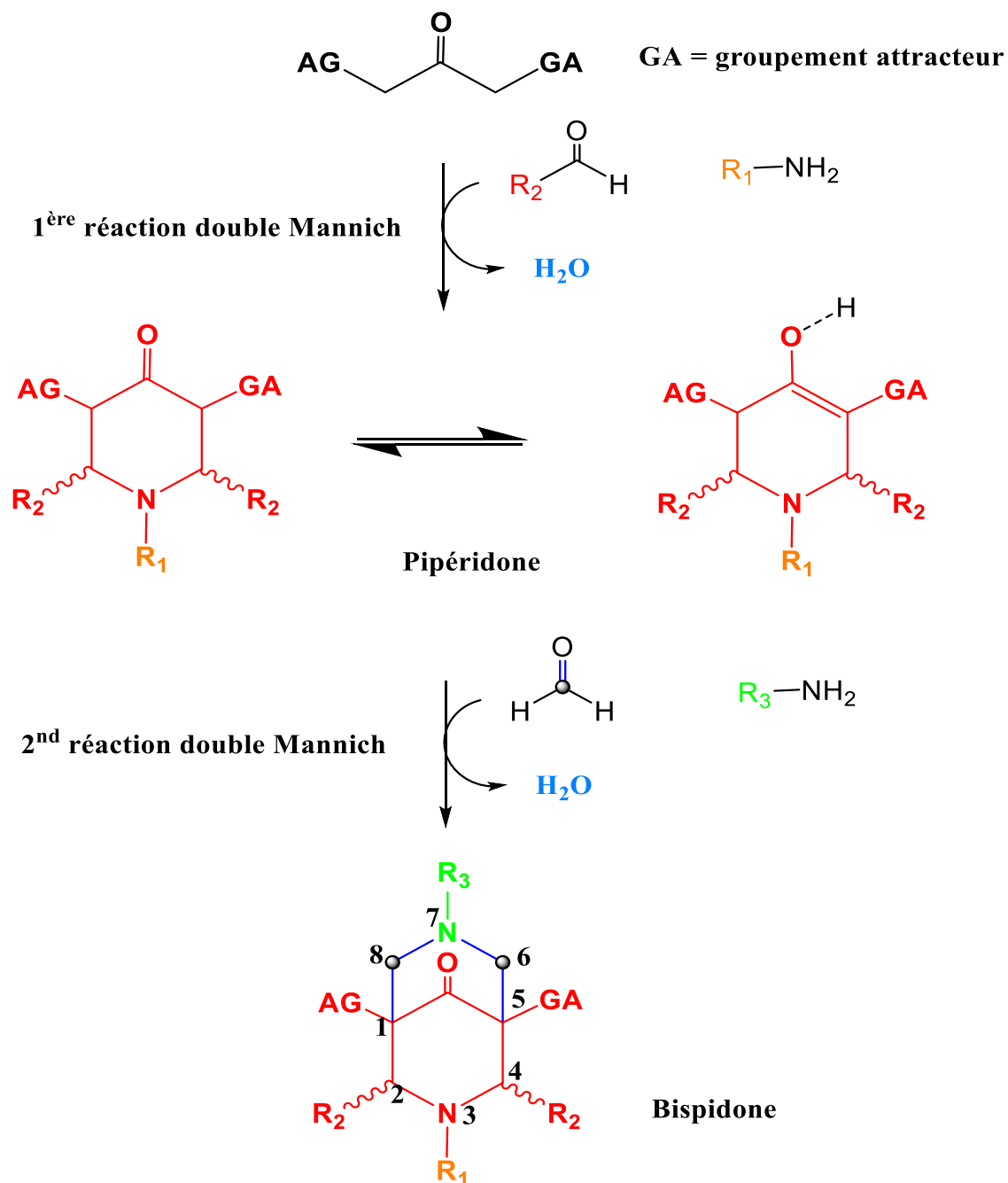


Figure 1.30 : Schéma général de la synthèse d'une bispidone.

Dans la plupart des cas, le groupement électro-attracteur est un acide carboxylique ou un ester et le groupement R_2 est un hétérocycle aromatique (par exemple une pyridine, un acide picolinique).

Les caractéristiques (par exemple fonction chimique, taille, centre de chiralité) des groupements R_1 et R_3 varient en fonction des applications envisagées. Pour des raisons de stabilité, dans

Introduction générale

certains cas, la fonction cétone de la bispidone est réduite en alcool pour donner le bispidol (figure 1.31). C'est une réaction stéréosélective.

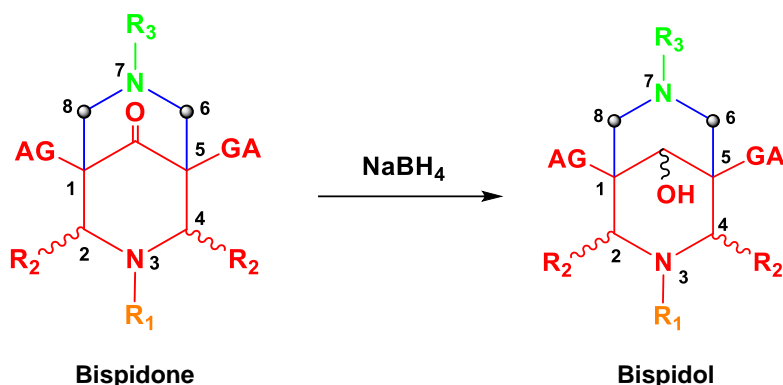


Figure 1.31 : Réduction de la bispidone en bispidol.

Les réactions qui mènent à l'obtention de la bispidone sont stéréo-contrôlées et dépendent exclusivement de la nature des groupements R_1 , R_2 et R_3 , et plus particulièrement de leur taille.

5.1.2. Stéréochimie

La stéréochimie joue un rôle primordial par rapport à l'activité biologique ou pharmacologique¹³⁷ des bispidines, ainsi que leurs propriétés catalytiques et modes de coordination avec les métaux.

En fonction de la nature des groupements R_1 et R_3 et du degré de protonation (mono ou diprotoné) des hétéroatomes (azote) du bicyclic, la bispidine peut adopter différentes conformations : chaise-chaise, bateau-chaise et bateau-bateau (figure 1.32).¹³⁸

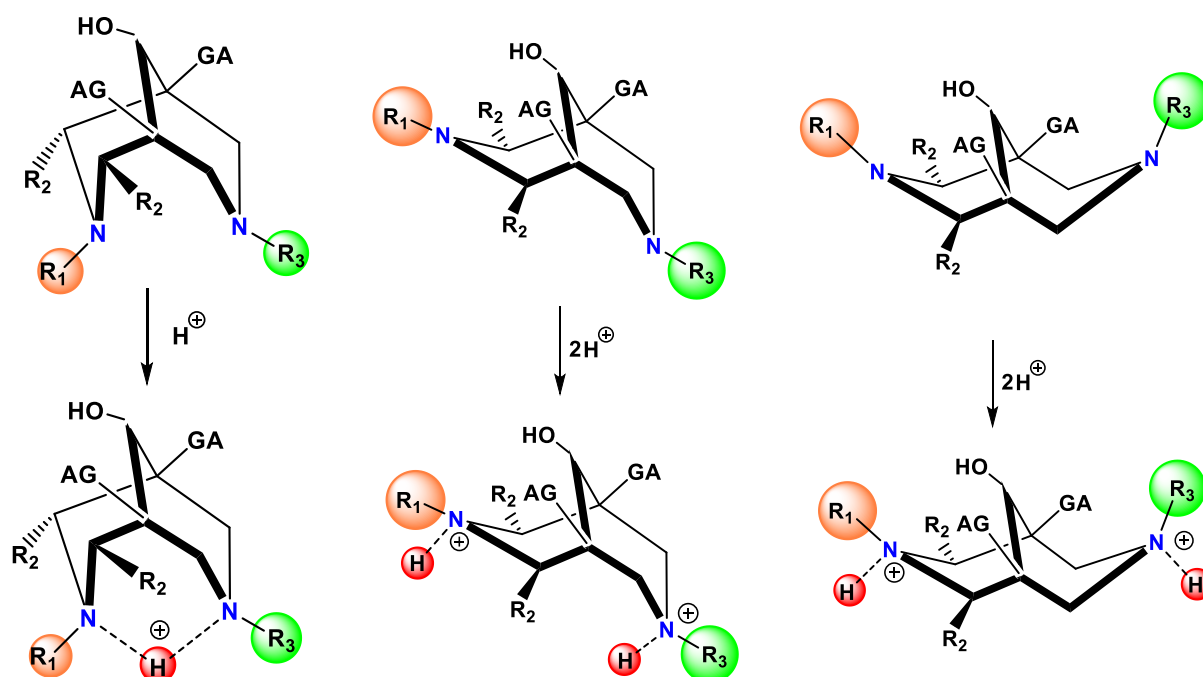


Figure 1.32 : Représentation des conformations adaptées par le noyau de la bispidine en fonction du volume des groupements R_1 et R_3 et de l'état de protonation des azotes de l'hétérocycle. $R_2 = H, py, pa, etc.$

En solution, la conformation chaise-chaise est la plus répandue avec les groupements R_1 et R_3 pointant à l'extérieur de la cavité, et une mono-protonation permettant la formation d'un pseudo-cycle à six chaînons qui renforce la stabilité du ligand. L'introduction de groupements volumineux (par exemple tertibutyle) ou la diprotonation peuvent conduire aux conformations bateau-chaise et bateau-bateau qui peuvent représenter jusqu'à 70 % de la population détectée par RMN.¹³⁸

Les substituants sur les carbones 2 et 4 (R_2) peuvent se positionner sur le plan axial ou équatorial, et en conséquence, ils peuvent être en position *cis* ou *trans* (figure 1.33). La position relative des azotes ($R_2 = \text{pyridine}$) vis-à-vis de la cavité confère aux bispidines des isomères de structures (*syn-syn*, *syn-anti*, *anti-anti* ; figure 1.33).

Introduction générale

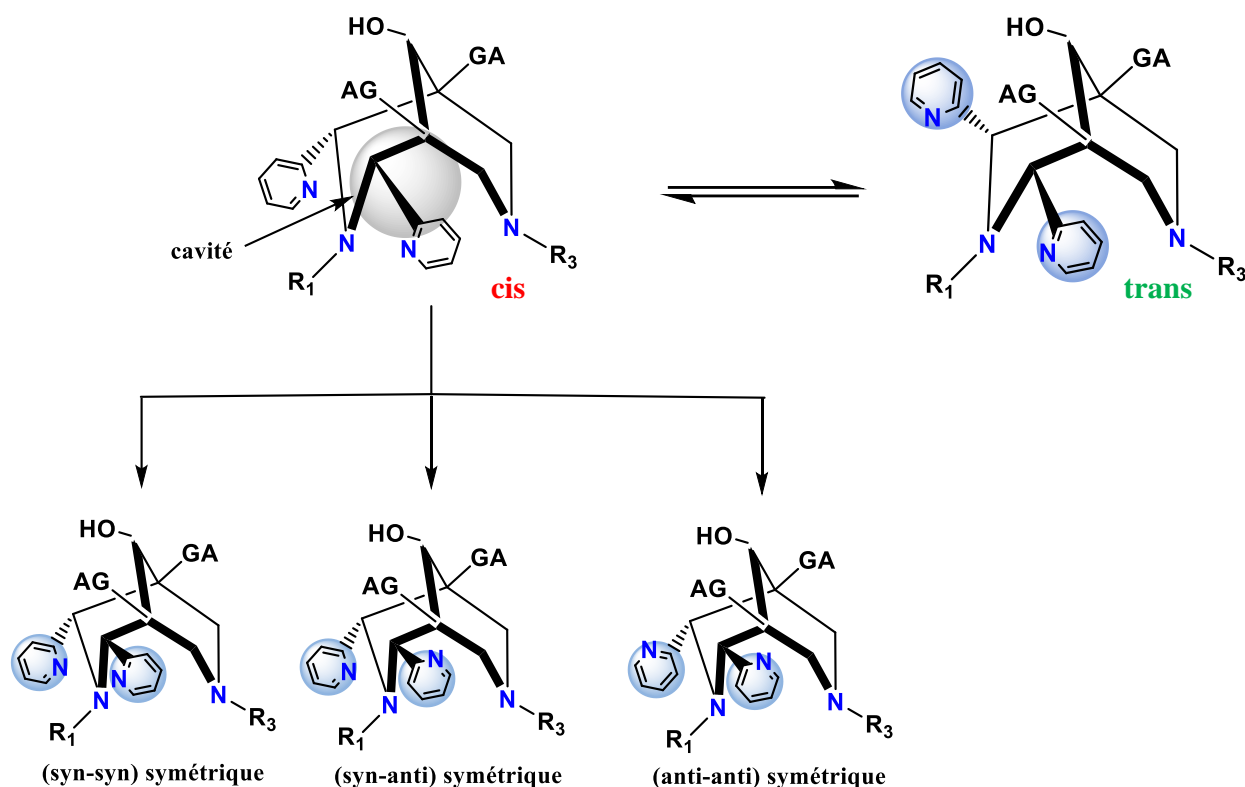


Figure 1.33 : Représentation des diastéréoisomères (cis-trans) et isomères de structures.

En absence de centre stéréogène et de chiralité hélicoïdale (axiale), les bispidines peuvent avoir une chiralité planaire quand les groupements R_1 et R_3 sont identiques (figure 1.34).¹³⁷

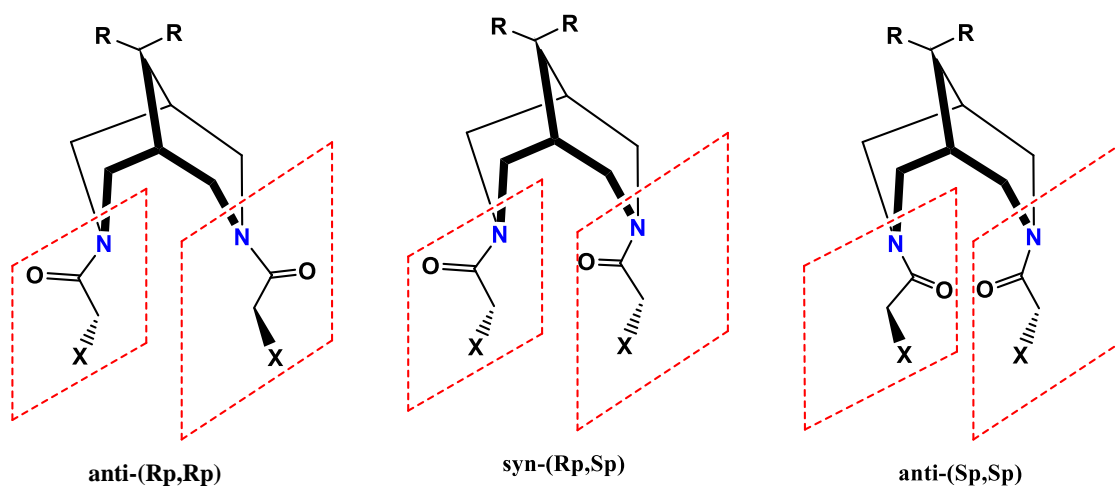


Figure 1.34 : Illustration de la chiralité planaire et des positions que peuvent occuper des groupements carbonyles ($R = OEt, H$; $X = Cl, I, H$).

Avec une structure pré-organisée et rigide, les bispidines offrent une palette d'applications allant du domaine de la chimie de coordination à la recherche médicale et plus particulièrement l'imagerie médicale.

5.2. Applications des bispidines et de leurs complexes

Dans un premier temps, les bispidines ont été développées dans le cadre de la recherche médicale pour leurs propriétés antiplaquettaires¹³⁹, antalgiques¹⁴⁰ et analgésiques¹³⁴ (figure 1.35).

Avec un centre asymétrique au niveau du groupement R₃, elles peuvent être utilisées comme catalyseurs chiraux lors d'une réaction de Mannich asymétrique (figure 1.35).¹⁴¹

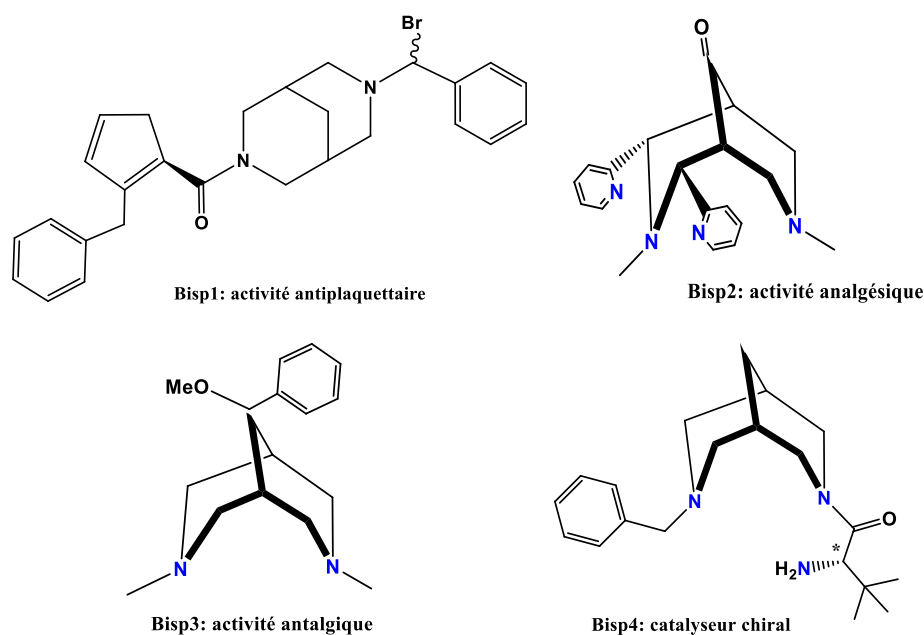


Figure 1.35 : Exemples de bispidines et de leurs applications biologiques ou catalytiques.

Possédant une structure pré-organisée et rigide, les bispidines connaissent des applications en chimie de coordination.

Un complexe de cobalt $[\text{Co}(\text{Bisp5})(\text{NO}_3)]^+$, dans lequel le métal est hexa-coordiné dans une géométrie octaédrique distordue (figure 1.36), a été étudié dès 1971.¹⁴²

La conformation adaptée par les bispidines pour la complexation des métaux de transition est typiquement chaise-chaise où les substituants R₂ se trouvent en position *cis*.

Introduction générale

Le Pr. Peter Comba, le Dr. Loïc Charbonnière et coll. ont fortement contribué aux développements des complexes des bispidines avec des métaux de transition.

Pour la complexation du Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} ou Zn^{2+} , différentes générations de bispidines hexa-dentées ont été développées¹⁴³ en fonction de la nature des groupements R_1 et R_3 .

Une première génération avec une géométrie octaédrique à élongation tétragonale (Bisp6 ; figure 1.36), une deuxième génération ayant une géométrie prismatique trigonale déformée (Bisp7 ; figure 1.36) au niveau du centre métallique, une troisième génération à base de pyrazole (Bisp8 ; figure 1.36).

Pour ces trois générations de bispidines, les groupements R_1 et R_3 sont identiques ; et en 2015, le Pr. Peter Comba développe une nouvelle génération de bispidines dont les groupements R_1 et R_3 diffèrent (Bisp9 ; figure 1.36).¹⁴⁴

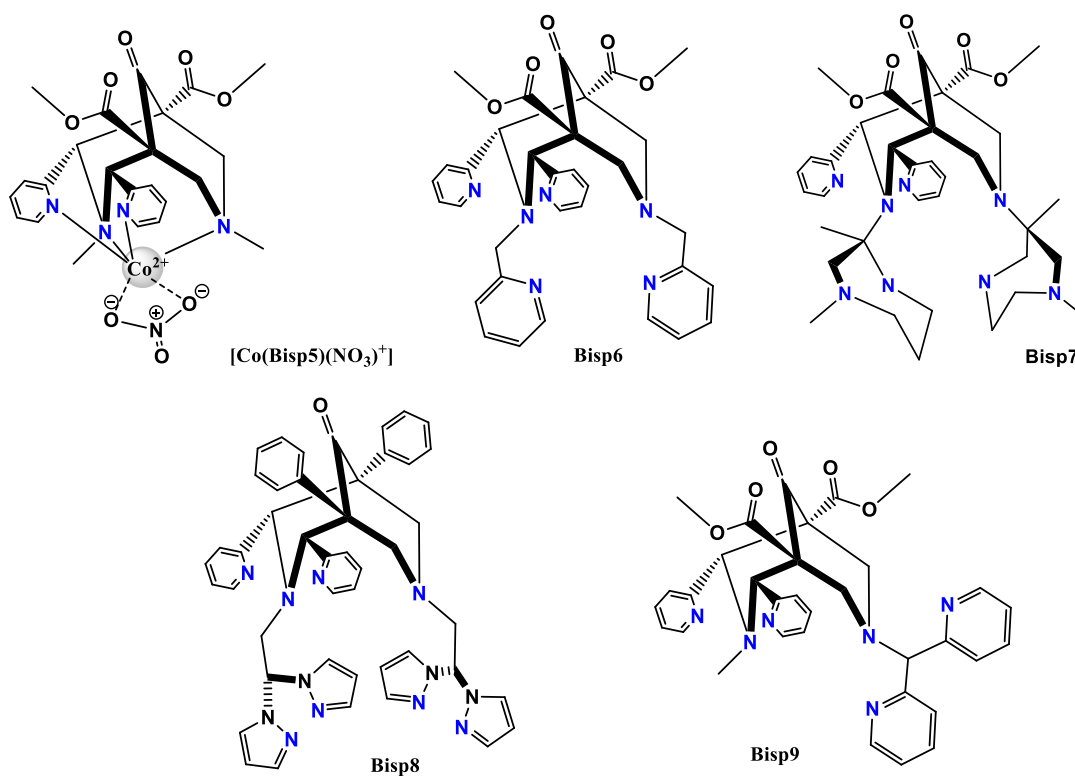


Figure 1.36 : Représentation du complexe de Co^{2+} hexa-coordiné et des différentes générations de bispidine.

Chapitre 1

La présence d'une structure pré-organisée au sein des bispidines a été confortée par l'étude menée par le Pr. Peter Comba et coll.¹⁴⁵ sur deux isomères de position $[\text{Cu}(\text{Bisp10})]^+$ et $[\text{Cu}(\text{Bisp11})]^+$ (figure 1.37). Les deux ligands sont hautement pré-organisés avec une géométrie octaédrique et sont bien adaptés pour les symétries tétraгонаles.

Pour l'isomère $\text{Cu}(\text{Bisp10})$, avec le groupement picolinate porté par l'azote N7, la fonction carboxylate se positionne axialement et pour l'isomère $\text{Cu}(\text{Bisp11})$, le picolinate porté par l'azote N3, le carboxylate se retrouve sur le plan équatorial, au profit des deux pyridines qui se positionnent axialement.

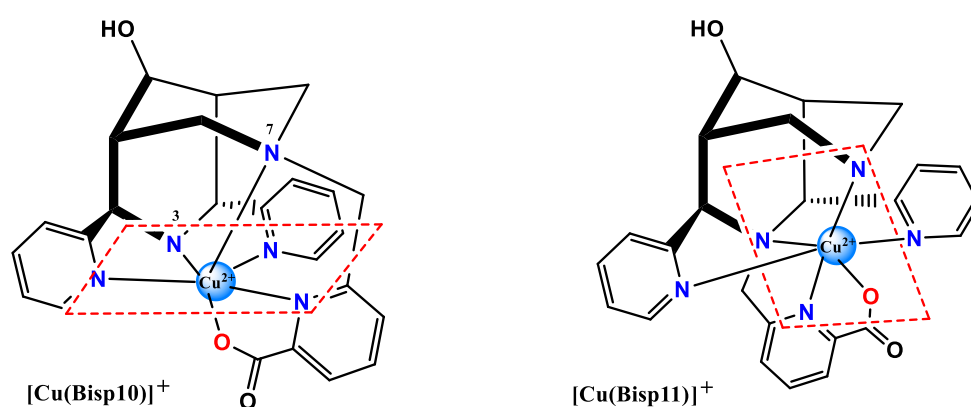


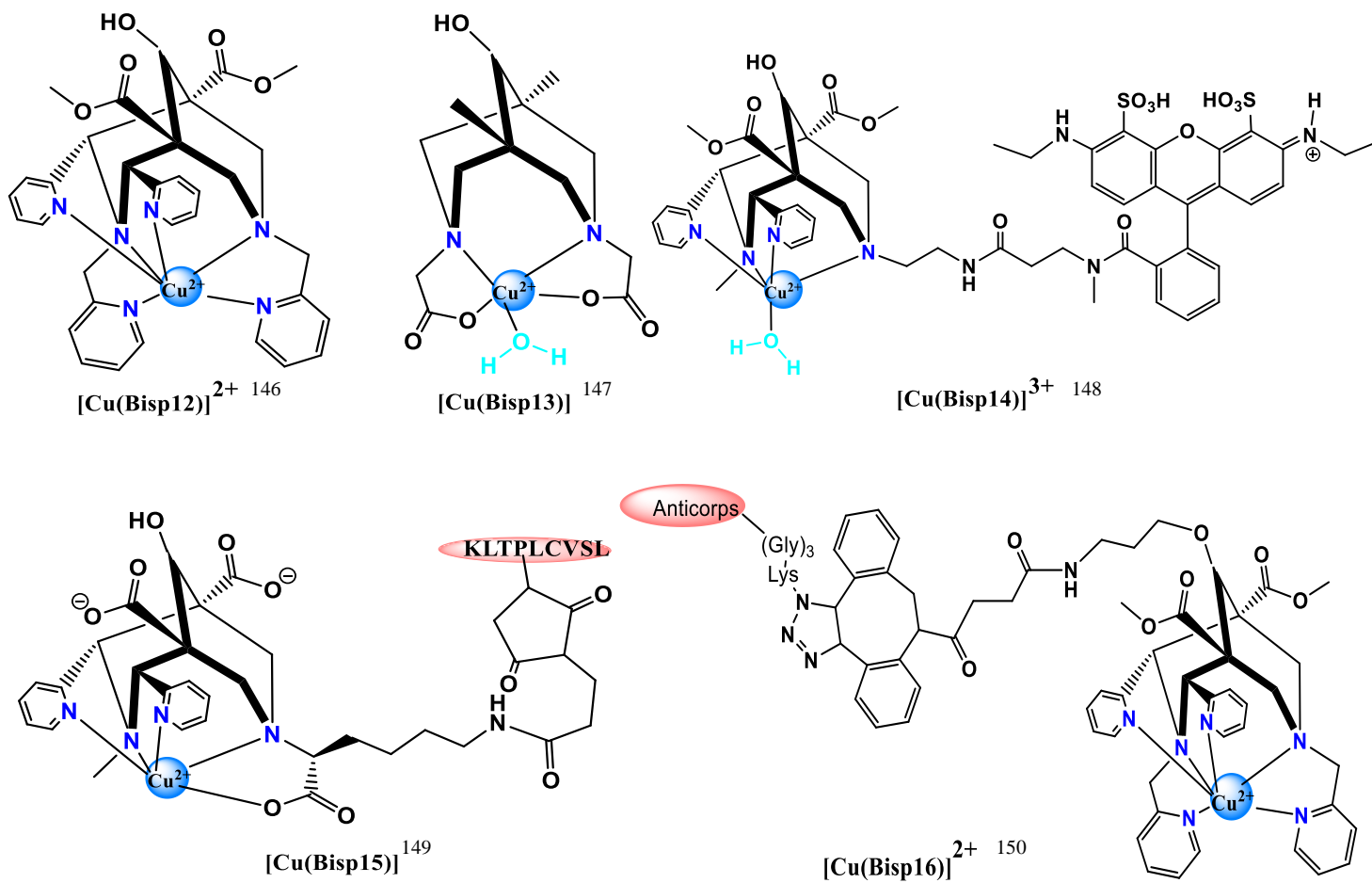
Figure 1.37 : Représentation des deux isomères de position.

Dans le domaine de l'imagerie médicale, plus particulièrement en tomographie par émission de positons (TEP), plusieurs complexes de $^{64}\text{Cu}^{2+}$ basés sur des bispidines, dès fois fonctionnalisées pour la détection de biomarqueurs ou la réalisation d'imagerie bimodale, ont été développés (figure 1.38-a).¹⁴⁶⁻¹⁵⁰

Des bispidines octa-dentées pour la complexation de l'indium ($^{111}\text{In}^{3+}$) destinées à des applications en tomographie par émission monophotonique (TEMP)) ont été proposées (figure 1.38-b).¹⁵¹⁻¹⁵²

Introduction générale

a)



b)

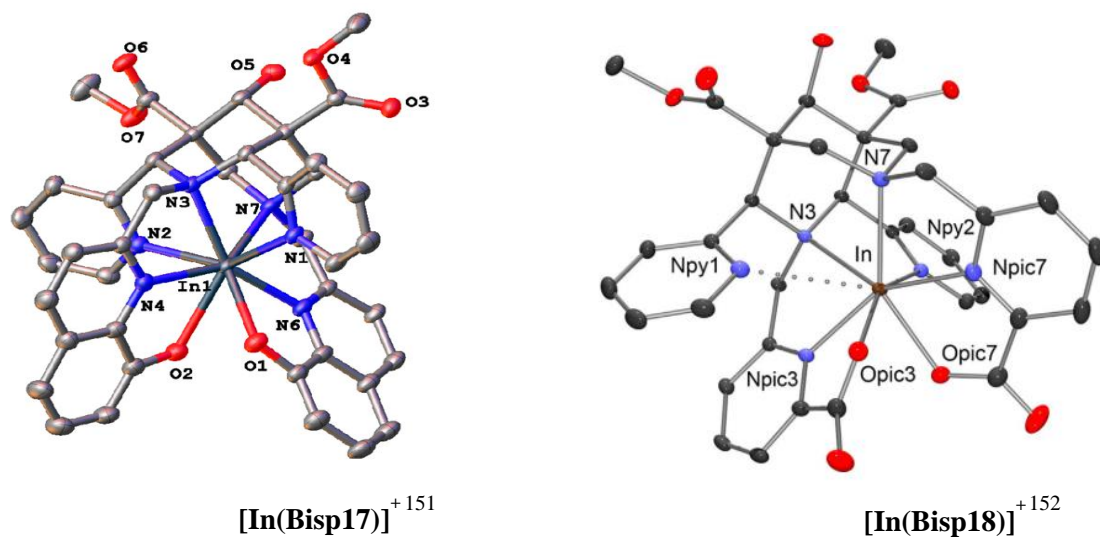


Figure 1.38 : a) Complexes de ⁶⁴Cu²⁺ pour la TEP ; b) Structures cristallines de complexes de ¹¹¹In³⁺ pour la TEMP.

6. Objectifs de la thèse

Suite aux préoccupations liées à la toxicité potentielle des complexes de Gd^{3+} utilisés en IRM, concevoir des agents de contraste plus sûrs devient un objectif de recherche très important. Le remplacement du Gd^{3+} par d'autres cations paramagnétiques semble être aujourd'hui la direction principale dans ces recherches, et le Mn^{2+} représente l'alternative la plus viable. Bien que le manganèse soit un métal essentiel pour l'organisme, dans les concentrations nécessaires en IRM, il serait toxique. Dans ce contexte, l'objectif principal de cette thèse s'articule autour de la conception de complexes de Mn^{2+} hautement inertes, stables et efficaces pour des applications en imagerie par résonance magnétique, mais également en imagerie bimodale (IRM/TEP).

Jusqu'ici, $Mn(PC2A-EA)$ a été le complexe de Mn^{2+} monohydraté le plus inerte connu, avec un temps de demi-vie de dissociation de 54,4 h (pH 6, 25 equiv. Zn^{2+} , 37 °C).⁸⁶ Néanmoins, cette bonne inertie reste loin derrière celle des agents de contraste à base de Gd^{3+} formés avec des ligands macrocycliques et en particulier avec le DOTA.¹⁵³ Des données de la littérature montrent clairement que la rigidité du ligand est un paramètre particulièrement important, et par conséquent, une augmentation très considérable de l'inertie des complexes de Mn^{2+} ne peut être atteinte qu'avec des ligands présentant une rigidité spécifique, qui engendre la formation d'une cage où loge le Mn^{2+} .

En plus de l'amélioration de l'inertie des complexes de Mn^{2+} , identifier des ligands qui permettraient une sélectivité pour le Mn^{2+} vis-à-vis du Zn^{2+} , le compétiteur principal du Mn^{2+} dans le milieu biologique, constitue un autre objectif de cette thèse. En effet, comme prédit par la série Irving-Williams, la taille plus grande du Mn^{2+} vs. celle du Zn^{2+} conduit à des stabilités plus faibles, qui ne peuvent être potentiellement contrecarrées que par des ligands avec une cavité de coordination très rigide et parfaitement adaptée au Mn^{2+} .

Pour répondre à ces objectifs, des ligands de type bispidine semblaient être particulièrement intéressants. Nous avons établi des collaborations avec les équipes du Dr. Loïc Charbonnière et d'Aline Nonat de l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC) du CNRS à Strasbourg (dans le cadre d'un projet ANR) et du Pr. Peter Comba de l'Université d'Heidelberg, en Allemagne, tous les deux spécialistes de la chimie des bispidines, pour la synthèse de tels ligands. Ces deux collaborations nous ont donné accès à une grande diversité structurale, avec

Introduction générale

des ligands penta-, hexa-, hepta- et octa-dentés, portant diverses fonctions chimiques (carboxylates, phosphonates, etc), dans des positions différentes. Cette diversité structurale nous permet de comprendre comment ces différents éléments structuraux déterminent la stabilité, l'inertie, l'échange d'eau, ou encore les paramètres de relaxation des complexes de Mn^{2+} .

Jusqu'ici, dans le domaine de l'imagerie médicale, des complexes de $^{64}Cu^{2+}$, $^{68}Ga^{3+}$ ou $^{111}In^{3+}$ basés sur des bispidines ont été développés pour des applications en TEP ou TEMP. Nous avons exploré pour la première fois cette famille de ligands pour la complexation du Mn^{2+} en tant qu'agents de contraste IRM. Bien que certaines propriétés souhaitées soient identiques pour toutes applications d'imagerie, comme une bonne stabilité et une bonne inertie des chélates, d'autres sont spécifiques à l'IRM. Ainsi, la présence d'une molécule d'eau sera indispensable dans le complexe de Mn^{2+} afin d'avoir une efficacité de relaxation.

Dans le **chapitre 2**, on présentera l'étude d'un complexe de Mn^{2+} basé sur une bispidine penta-dentée développée par l'équipe du Dr. Loïc Charbonnière, nommée L^1 , dont le complexe $Mn(L^1)$ est particulièrement inerte et possède une bonne efficacité IRM.

Le **chapitre 3** portera sur une étude de la relation entre la structure et les propriétés physico-chimiques des complexes de Mn^{2+} ; le changement de la nature ou de la position des groupements fonctionnels qui tapissent le noyau de la bispidine pourrait entraîner des variations significatives de leurs propriétés physico-chimiques.

Cependant, un point faible de tous ces complexes reste leur stabilité modeste.

Pour pallier ce fait, dans le **chapitre 4**, nous avons étudié des complexes de Mn^{2+} basés sur des bispidines hepta- et octa-dentées développées par l'équipe du Pr. Peter Comba, de l'université Heidelberg, Allemagne.

Les conclusions générales et perspectives de cette thèse sont l'objet du **chapitre 5**.

La partie expérimentale sera abordée dans le **chapitre 6**.

Références

1. Agarwal, R.; Brunelli, S. M.; Williams, K.; Mitchell, M. D.; Feldman, H. I.; Umscheid, C. A., Gadolinium-based contrast agents and nephrogenic systemic fibrosis: a systematic review and meta-analysis. *Nephrology Dialysis Transplantation* **2008**, *24* (3), 856-863.
2. Gianolio, E.; Bardini, P.; Arena, F.; Stefania, R.; Di Gregorio, E.; Iani, R.; Aime, S., Gadolinium Retention in the Rat Brain: Assessment of the Amounts of Insoluble Gadolinium-containing Species and Intact Gadolinium Complexes after Repeated Administration of Gadolinium-based Contrast Agents. *Radiology* **2017**, *285* (3), 839-849.
3. Lauterbur, P. G., *Nature* **1973**, *242*, 190-191.
4. Korestky, A. P.; Silva, A. C., Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *NMR in Biomedicine* **2004**, *17*, 527-531.
5. Massaad, C. A.; Pautler, R. G., Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2011**, *711*, 145-74.
6. Aschner, M.; Erikson, K. M.; Dorman, D. C., Manganese dosimetry: Species differences and implications for neurotoxicity. *Critical Reviews in Toxicology* **2005**, *35* (1), 1-32.
7. Cersosimo, M. G.; Koller, W. C., The diagnosis of manganese-induced parkinsonism. *Neurotoxicology* **2006**, *27* (3), 340-346.
8. Manganese. <https://fr.wikipedia.org/wiki/Mangan%C3%A8se>.
9. A. D. McNaught, A. W., *Transition element : an element whose atom has an incomplete d sub-shell, or which can give rise to cations with an incompleted d sub-shell*. 1997.
10. El-Shwiniy, W. H.; Shehab, W. S.; Zordok, W. A., Spectral, thermal, DFT calculations, anticancer and antimicrobial studies for bivalent manganese complexes of pyrano [2,3-d]pyrimidine derivatives. *Journal of Molecular Structure* **2020**, *1199*, 126993.
11. Rouco, L.; Liberato, A.; Fernández-Trujillo, M. J.; Máñez, A.; Basallote, M. G.; Alvariño, R.; Alfonso, A.; Botana, L. M.; Maneiro, M., Salen-manganese complexes for controlling ROS damage: Neuroprotective effects, antioxidant activity and kinetic studies. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2020**, *203*, 110918.
12. Wegermann, C. A.; Ribeiro, R. R.; Ucoski, G. M.; Nakagaki, S.; Nunes, F. S.; Drechsel, S. M., Study of the catalytic activity of non-heme manganese complexes toward oxidation of cyclooctene and cyclohexene. *Applied Catalysis A: General* **2014**, *471*, 56-62.
13. Qin, Y.; She, P.; Huang, X.; Huang, W.; Zhao, Q., Luminescent manganese(II) complexes: Synthesis, properties and optoelectronic applications. *Coordination Chemistry Reviews* **2020**, *416*, 213331.
14. Pearson, R. G., Hard and Soft Acids and Bases. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85* (22), 3533-3539.
15. Moulin, N.; Hussonnois, M.; Brillard, L.; Guillaumont, R., Fonctions thermodynamiques de complexes halogénés de Sm, Eu, Gd, Tb et Dy. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry* **1975**, *37* (12), 2521-2524.
16. Choppin, G. R., Lanthanide complexation in aqueous solutions. *Journal of the Less Common Metals* **1984**, *100*, 141-151.
17. Klein, A. T. J.; Rösch, F.; Coenen, H. H.; Qaim, S. M., Labelling of manganese-based magnetic resonance imaging (MRI) contrast agents with the positron emitter ⁵¹Mn, as exemplified by manganese-tetraphenyl-porphin-sulfonate (MnTPPS4). *Applied Radiation and Isotopes* **2005**, *62* (5), 711-720.
18. Gawne, P.; Man, F.; Fonslet, J.; Radia, R.; Bordoloi, J.; Cleveland, M.; Jimenez-Royo, P.; Gabizon, A.; Blower, P. J.; Long, N.; de Rosales, R. T. M., Manganese-52: applications in cell

Introduction générale

radiolabelling and liposomal nanomedicine PET imaging using oxine (8-hydroxyquinoline) as an ionophore. *Dalton Transactions* **2018**, 47 (28), 9283-9293.

19. Graves, S. A.; Hernandez, R.; Fonslet, J.; England, C. G.; Valdovinos, H. F.; Ellison, P. A.; Barnhart, T. E.; Elema, D. R.; Theuer, C. P.; Cai, W.; Nickles, R. J.; Severin, G. W., Novel Preparation Methods of ^{52}Mn for ImmunoPET Imaging. *Bioconjugate Chemistry* **2015**, 26 (10), 2118-2124.

20. Jensen, A. I.; Severin, G. W.; Hansen, A. E.; Flidner, F. P.; Eliassen, R.; Parhamifar, L.; Kjær, A.; Andresen, T. L.; Henriksen, J. R., Remote-loading of liposomes with manganese-52 and in vivo evaluation of the stabilities of ^{52}Mn -DOTA and ^{64}Cu -DOTA using radiolabelled liposomes and PET imaging. *Journal of Controlled Release* **2018**, 269, 100-109.

21. 2002.

22. Basumatary, D.; Lal, R. A.; Kumar, A., Synthesis, and characterization of low- and high-spin manganese(II) complexes of polyfunctional adipoyldihydrazone: Effect of coordination of N-donor ligands on stereo-redox chemistry. *Journal of Molecular Structure* **2015**, 1092, 122-129.

23. Bacciu, D.; Chen, C.-H.; Surawatanawong, P.; Foxman, B. M.; Ozerov, O. V., High-Spin Manganese(II) Complexes of an Amido/Bis(Phosphine) PNP Ligand. *Inorganic Chemistry* **2010**, 49 (11), 5328-5334.

24. Liao, M.-S.; Watts, J. D.; Huang, M.-J., DFT Study of Unligated and Ligated Manganese(II) Porphyrins and Phthalocyanines. *Inorganic Chemistry* **2005**, 44 (6), 1941-1949.

25. Haacke, E.; Brown, R. W.; Thompson, M. R.; Venkatesan, R., *Magnetic Resonance Imaging : Physical Principles and sequence Design*. John Wiley & Sons: Chichester, 1999.

26. Callaghan, P. T. Principles of Nuclear Magnetic Resonance Microscopy.

27. Bernstein, M. A.; King, K. F.; Zhou, X. J., *Handbook of MRI Pulse Sequences*. Elsevier, 2004.

28. 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 (9), 2293-2352.

29. Caravan, P.; Lauffer, R. B., *Basic principles : In clinical Magnetic Resonance Imaging*. 3rd ed.; Cruess J. V.: 2005; Vol. 1.

30. Caravan, P.; Farrara, C. T.; Frullano, L.; Uppal, R., Influence of molecular parameters and increasing magnetic field strength on relaxivity of gadolinium- and manganese-based T1 contrast agents. *Contrast Media of Molecular Imaging* **2009**, 4, 89-100.

31. Malikidogo, K. P.; Martin, H.; Bonnet, C. S., From Zn(II) to Cu(II) Detection by MRI Using Metal-Based Probes: Current Progress and Challenges. *Pharmaceuticals* **2020**, 13 (12).

32. Bloembergen, N.; Purcell, E. M.; Pound, R. V., Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption. *Physical Review* **1948**, 73 (7), 679-712.

33. Solomon, I.; Bloembergen, N., *J.Chem.Phys.* **1956**, 25, 261-266.

34. Bloembergen, N., Proton relaxation times in paramagnetic solutions. *J.Chem.Phys.* **1957**, 27 (2), 572-573.

35. Solomon, I., Relaxation Processes in a System of Two Spins. *Physical Review* **1955**, 99 (2), 559-565.

36. Merbach, A. E.; Helm, L.; Toth, E., *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*. second ed.; John Wiley & Sons: Chichester, 2013.

37. Kim, W. D.; Kiefer, G. E.; Maton, F.; McMillan, K.; Muller, R. N.; Sherry, A. D., Relaxometry, Luminescence Measurements, Electrophoresis and Animal Biodistribution of Lanthanide(III) Complexes of Some Polyaza Macrocyclic Acetates Containing Pyridine. *Inorganic Chemistry* **1995**, 34, 2233-2243.

38. Botta, M.; Carniato, F.; Esteban-Gomez, D.; Platas-Iglesias, C.; Tei, L., Mn(II) compounds as an alternative to Gd-based MRI probes. *Future medicinal chemistry* **2019**, 11 (12), 1461-1483.

39. Esteban-Gomez, D.; Cassino, C.; Botta, M.; Platas-Iglesias, C., ^{17}O and ^1H relaxometric and DFT study of hyperfine coupling constants in $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$. *RSC Adv* **2014**, *4* (14), 7094-7103.
40. Botta, M.; Aime, S.; Barge, A.; Bobba, G.; Dickins, R. S.; Parker, D.; Terreno, E., Ternary Complexes between Cationic GdIII Chelates and Anionic Metabolites in Aqueous Solution: An NMR Relaxometric Study. *Chemistry – A European Journal* **2003**, *9* (9), 2102-2109.
41. Gale, E. M.; Zhu, J.; Caravan, P., Direct Measurement of the Mn(II) Hydration State in Metal Complexes and Metalloproteins through O-17 NMR Line Widths. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135* (49), 18600-18608.
42. Forgács, A.; Regueiro-Figueroa, M.; Barriada, J. L.; Esteban-Gómez, D.; de Blas, A.; Rodríguez-Blas, T.; Botta, M.; Platas-Iglesias, C., Mono-, Bi-, and Trinuclear Bis-Hydrated Mn^{2+} Complexes as Potential MRI Contrast Agents. *Inorganic Chemistry* **2015**, *54* (19), 9576-9587.
43. Rolla, G. A.; Platas-Iglesias, C.; Botta, M.; Tei, L.; Helm, L., H-1 and O-17 NMR Relaxometric and Computational Study on Macrocyclic Mn(II) Complexes. *Inorganic Chemistry* **2013**, *52* (6), 3268-3279.
44. Forgacs, A.; Tei, L.; Baranyai, Z.; Toth, I.; Zekany, L.; Botta, M., A Bisamide Derivative of Mn(1,4-DO2A) - Solution Thermodynamic, Kinetic, and NMR Relaxometric Studies. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2016**, (8), 1165-1174.
45. Sweet, W. H., *New England Journal of Medicine* **1951**, *245*, 875-878.
46. Guilleman, J. Radiopharmaceutiques.
47. Krasikova, R. N.; Aliev, R. A.; Kalmykov, S. N., The next generation of positron emission tomography radiopharmaceuticals labeled with non-conventional radionuclides. *Mendeleev Communications* **2016**, *26* (2), 85-94.
48. Goud, N. S.; Bhattacharya, A.; Joshi, R. K.; Nagaraj, C.; Bharath, R. D.; Kumar, P., Carbon-11: Radiochemistry and Target-Based PET Molecular Imaging Applications in Oncology, Cardiology, and Neurology. *Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, *64* (3), 1223-1259.
49. Ulke, C.; Rullmann, M.; Huang, J.; Luthardt, J.; Becker, G.-A.; Patt, M.; Meyer, P. M.; Tiepolt, S.; Hesse, S.; Sabri, O.; Strauß, M., Adult attention-deficit/hyperactivity disorder is associated with reduced norepinephrine transporter availability in right attention networks: a (S,S)-O-[^{11}C]methylreboxetine positron emission tomography study. *Translational Psychiatry* **2019**, *9* (1), 301.
50. Kumata, K.; Ogawa, M.; Takei, M.; Fujinaga, M.; Yoshida, Y.; Nengaki, N.; Fukumura, T.; Suzuki, K.; Zhang, M.-R., Radiosynthesis of [^{13}N]dantrolene, a positron emission tomography probe for breast cancer resistant protein, using no-carrier-added [^{13}N]ammonia. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2012**, *20* (1), 305-310.
51. Ishii, K.; Sasaki, M.; Matsui, M.; Sakamoto, S.; Yamaji, S.; Hayashi, N.; Mori, T.; Kitagaki, H.; Hirono, N.; Mori, E., A diagnostic method for suspected Alzheimer's disease using H ^{215}O positron emission tomography perfusion Z score. *Neuroradiology* **2000**, *42* (11), 787-794.
52. Xie, H.-J.; Yu, Y.-F.; Sun, X.-S.; Jia, G.-D.; Luo, D.-H.; Sun, R.; Liu, L.-T.; Guo, S.-S.; Liu, S.-L.; Chen, Q.-Y.; Tang, L.-Q.; Mai, H.-Q., Identifying optimal candidates for induction chemotherapy among stage II–IVa nasopharyngeal carcinoma based on pretreatment Epstein–Barr virus DNA and nodal maximal standard uptake values of [^{18}F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Cancer Medicine* **2020**, *9* (23), 8852-8863.
53. Zhu, A.; Lee, D.; Shim, H., Metabolic positron emission tomography imaging in cancer detection and therapy response. *Semin Oncol* **2011**, *38* (1), 55-69.
54. Ou, Y.-N.; Xu, W.; Li, J.-Q.; Guo, Y.; Cui, M.; Chen, K.-L.; Huang, Y.-Y.; Dong, Q.; Tan, L.; Yu, J.-T.; on behalf of Alzheimer's Disease Neuroimaging, I., FDG-PET as an independent biomarker

Introduction générale

for Alzheimer's biological diagnosis: a longitudinal study. *Alzheimer's Research & Therapy* **2019**, *11* (1), 57.

55. Dietz, M.; Chironi, G.; Claessens, Y.-E.; Farhad, R. L.; Rouquette, I.; Serrano, B.; Nataf, V.; Hugonnet, F.; Paulmier, B.; Berthier, F.; Keita-Perse, O.; Giammarile, F.; Perrin, C.; Faraggi, M.; Fissore-Magdelein, C.; Gabriel-Solean, S.; Dahmani, B.; Riss, I.; Sorlin, P.; Dupasquier, V.; Pathak, A.; Dugourd, C.; Nicolai, M.; Rijo, N.; Beau, N.; Magdelein, X.; Olyve, F.; Chaillou-Orpitz, S.; Lépine, J.; Lorillou, M.; Maincent, C.; Bertrand, S.; Brunner, P.; Dittlot, C.; Fuerxer, F.; Liberatore, M.; Armando, G.; Bouregba, M.; Catoire, J.; Garcia, P.; Tran, D.; for the, M. G., COVID-19 pneumonia: relationship between inflammation assessed by whole-body FDG PET/CT and short-term clinical outcome. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2021**, *48* (1), 260-268.

56. Hennrich, U.; Eder, M., [68Ga]Ga-PSMA-11: The First FDA-Approved 68Ga-Radiopharmaceutical for PET Imaging of Prostate Cancer. *Pharmaceuticals* **2021**, *14* (8).

57. Satpati, D., Recent Breakthrough in 68Ga-Radiopharmaceuticals Cold Kits for Convenient PET Radiopharmacy. *Bioconjugate Chemistry* **2021**, *32* (3), 430-447.

58. Pruszyński, M.; Majkowska-Pilip, A.; Loktionova, N. S.; Eppard, E.; Roesch, F., Radiolabeling of DOTATOC with the long-lived positron emitter 44Sc. *Applied Radiation and Isotopes* **2012**, *70* (6), 974-979.

59. Bansal, A.; Pandey, M. K.; Yamada, S.; Goyal, R.; Schmit, N. R.; Jeon, R.; Nesbitt, J. J.; Witt, T. A.; Singh, R. D.; Gunderson, T. M.; Boroumand, S.; Li, M.; Crespo-Diaz, R. J.; Hillestad, M. L.; Terzic, A.; Behfar, A.; DeGrado, T. R., [89Zr]Zr-DBN labeled cardiopoietic stem cells proficient for heart failure. *Nuclear Medicine and Biology* **2020**, *90-91*, 23-30.

60. Yoon, J.-K.; Park, B.-N.; Ryu, E.-K.; An, Y.-S.; Lee, S.-J., Current Perspectives on (89)Zr-PET Imaging. *Int J Mol Sci* **2020**, *21* (12), 4309.

61. Zhou, Y.; Li, J.; Xu, X.; Zhao, M.; Zhang, B.; Deng, S.; Wu, Y., (64)Cu-based Radiopharmaceuticals in Molecular Imaging. *Technol Cancer Res Treat* **2019**, *18*, 1533033819830758-1533033819830758.

62. Tapan K. Nayak, C. A. S. R., Karen J. Wong, Diane E. Milenic, Kayhan Garmestani, Kwamena E. Baidoo, Lawrence P. Szajek, Martin W. Brechbiel, PET imaging of HER1-expressing xenografts in mice with 86Y-CHX-A''-DTPA-cetuximab. *European Journal Nuclear Medicinal Molecular Imaging* **2011**, *37*, 1368-1376.

63. Napieczynska Hanna¹, S. G. W., Fonslet Jesper, Wiehr Stefan, Menegakis Apostolos, Pichler Bernd J, Calaminus Carsten, Imaging Neuronal Pathways with 52Mn PET. Toxicity Evaluation in Rats. *Neuroimage* **2017**, *158*, 112-125.

64. Le cyclotron. <https://www.futura-sciences.com/sciences/definitions/physique-cyclotron-123>.

65. Scintigraphie, PET-Scan. <https://www.medecine-nucleaire.fr/tomographie-emission-positons-tep.html>.

66. Langner, J. Developpement of a Parallel Computing Optimizal Head Movement Correction Method in Positron Emission Tomography.

67. Buck, A.; Nguyen, N.; Burger, C.; Ziegler, S.; Frey, L.; Weigand, G.; Erhardt, W.; Senekowitsch-Schmidtke, R.; Pellikka, R.; Bläuenstein, P.; Locher, J. T.; Schwaiger, M., Quantitative evaluation of manganese-52m as a myocardial perfusion tracer in pigs using positron emission tomography. *European journal of nuclear medicine* **1996**, *23* (12), 1619-27.

68. Chauncey, D. M., Jr.; Schelbert, H. R.; Halpern, S. E.; Delano, F.; McKegney, M. L.; Ashburn, W. L.; Hagan, P. L., Tissue distribution studies with radioactive manganese: a potential agent for myocardial imaging. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **1977**, *18* (9), 933-6.

69. Atkins, H. L.; Som, P.; Fairchild, R. G.; Hui, J.; Schachner, E.; Goldman, A.; Ku, T., Myocardial Positron Tomography with Manganese-52m. *Radiology* **1979**, *133* (3), 769-774.
70. Davidsson, L.; Cederblad, Å.; Hagebø, E.; Lønnerdal, B.; Sandström, B., Intrinsic and Extrinsic Labeling for Studies of Manganese Absorption in Humans. *The Journal of Nutrition* **1988**, *118* (12), 1517-1521.
71. Liu, G.; Dodgen, H. W.; Hunt, J. P., Water-exchange studies on aqueous manganese(II) and Cobalt(II) -o-phenylenediaminetetraacetate Complexes. *Inorganic Chemistry* **1977**, *16*, 2652-2653.
72. Zetter, M. S.; Wood, E. J.; Hunt, J. P.; Dodgen, H. W.; Grant, M. W., Water-exchange studies on manganese(II) nitrilotriacetate and ethylenediaminetetraacetate complexes by ¹⁷O Nuclear Magnetic Resonance. *Inorganic Chemistry* **1972**, *11* (11), 2701-2706.
73. Maigut, J.; Meier, R.; Zahl, A.; van Eldik, R., Effect of Chelate Dynamics on Water Exchange Reactions of Paramagnetic Aminopolycarboxylate Complexes. *Inorganic Chemistry* **2008**, *47* (13), 5702-5719.
74. Maigut, J.; Meier, R.; Zahl, A.; van Eldik, R., Triggering Water Exchange Mechanisms via Chelate Architecture. Shielding of Transition Metal Centers by Aminopolycarboxylate Spectator Ligands. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (44), 14556-14569.
75. Ducommun, Y.; Newman, K. E.; Merbach, A. E., High-Pressure ¹⁷O 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.
76. Aime, S.; Anelli, P. L.; Botta, M.; Brocchetta, M.; Canton, S.; Fedeli, F.; Gianolio, E.; Terreno, E., Relaxometric evaluation of novel manganese(II) complexes for application as contrast agents in magnetic resonance imaging. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2002**, *7*, 58-67.
77. Troughton, J. S.; Greenfield, M. T.; Greenwood, J. M.; Dumas, S.; Wiethoff, A. J.; Wang, J.; Spiller, M.; McMurphy, T.; Caravan, P., Synthesis and Evaluation of a High Relaxivity Manganese(II)-based MRI contrast Agent. *Inorganic Chemistry* **2004**, *43*, 6313-6323.
78. Islam, M. K.; Kim, S.; Kim, H.-K.; Park, S.; Lee, G.-H.; Kang, H. J.; Jung, J.-C.; Park, J.-S.; Kim, T.-J.; Chan, Y., Manganese Complex of Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)-Benzothiazole Aniline (BTA) Conjugate as a Potential Liver-Targeting MRI Contrast Agent. *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *60* (7), 2993-3001.
79. Islam, M. K.; Kim, S.; Kim, H. K.; Kim, Y. H.; Lee, Y. M.; Choi, G.; Baek, A. R.; Sung, B. K.; Kim, M.; Cho, A. E.; Kang, H.; Lee, G. H.; Choi, S. H.; Lee, T.; Park, J. A.; Chang, Y., Synthesis and Evaluation of Manganese(II)-Based Ethylenediaminetetraacetic Acid-Ethoxybenzyl Conjugate as a Highly Stable Hepatobiliary Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent. *Bioconjugate Chemistry* **2018**, *29* (11), 3614-3625.
80. Molnar, E.; Varadi, B.; Garda, Z.; Botar, R.; Kalman, F. K.; Toth, E.; Platas-Iglesias, C.; Toth, I.; Brucher, E.; Tircso, G., Remarkable differences and similarities between the isomeric Mn(II)-cis- and trans-1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetate complexes. *Inorganica Chimica Acta* **2018**, *472*, 254-263.
81. 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* (49), 15548-15557.
82. Forgacs, A.; Regueiro-Figueroa, M.; Barriada, J. L.; Esteban-Gomez, D.; de Blas, A.; Rodriguez-Blas, T.; Botta, M.; Platas-Iglesias, C., Mono-, bi-, and trinuclear bis-hydrated Mn(2+) complexes as potential MRI contrast agents. *Inorganic Chemistry* **2015**, *54* (19), 9576-87.
83. Balogh, E.; He, Z.; Hsieh, W.; Liu, S.; Toth, E., Dinuclear complexes formed with the triazacyclononane derivative ENOTA(4-): High-pressure O-17 NMR evidence of an associative water exchange on Mn-2(II)(ENOTA)(H₂O)(2). *Inorganic Chemistry* **2007**, *46* (1), 238-250.

Introduction générale

84. Pujales-Paradela, R.; Carniato, F.; Esteban-Gomez, D.; Botta, M.; Platas-Iglesias, C., Controlling water exchange rates in potential Mn(2+)-based MRI agents derived from NO₂A(2). *Dalton Transactions* **2019**, 48 (12), 3962-3972.
85. Zhou, Z.; Bai, R.; Wang, Z.; Bryant, H.; Lang, L.; Merkle, H.; Munasinghe, J.; Tang, L.; Tang, W.; Tian, R.; Yu, G.; Ma, Y.; Niu, G.; Gao, J.; Chen, X., An Albumin-Binding T1- T2 Dual-Modal MRI Contrast Agents for Improved Sensitivity and Accuracy in Tumor Imaging. *Bioconjugate Chemistry* **2019**, 30 (6), 1821-1829.
86. Botár, R.; Molnár, E.; Trencsényi, G.; Kiss, J.; Kálmán, F. K.; Tircsó, G., Stable and Inert Mn(II)-Based and pH-Responsive Contrast Agents. *Journal of the American Chemical Society* **2020**, 142 (4), 1662-1666.
87. Drahos, B.; Kotek, J.; Cisarova, I.; Hermann, P.; Helm, L.; Lukes, I.; Toth, E., Mn²⁺ Complexes with 12-Membered Pyridine Based Macrocycles Bearing Carboxylate or Phosphonate Pendant Arm: Crystallographic, Thermodynamic, Kinetic, Redox, and H-1/O-17 Relaxation Studies. *Inorganic Chemistry* **2011**, 50 (24), 12785-12801.
88. Drahos, B.; Kotek, J.; Hermann, P.; Lukes, I.; Toth, E., Mn²⁺ Complexes with Pyridine-Containing 15-Membered Macrocycles: Thermodynamic, Kinetic, Crystallographic, and H-1/O-17 Relaxation Studies. *Inorganic Chemistry* **2010**, 49 (7), 3224-3238.
89. Drahos, B.; Pniok, M.; Havlickova, J.; Kotek, J.; Cisarova, I.; Hermann, P.; Lukes, I.; Toth, E., Mn²⁺ complexes of 1-oxa-4,7-diazacyclononane based ligands with acetic, phosphonic and phosphinic acid pendant arms: Stability and relaxation studies. *Dalton Transactions* **2011**, 40 (39), 10131-10146.
90. 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 (9), 2025-32.
91. Vanasschen, C.; Molnar, E.; Tircso, G.; Kalman, F. K.; Toth, E.; Brandt, M.; Coenen, H. H.; Neumaier, B., Novel CDTA-based, Bifunctional Chelators for Stable and Inert Mn-II Complexation: Synthesis and Physicochemical Characterization. *Inorganic Chemistry* **2017**, 56 (14), 7746-7760.
92. Pota, K.; Garda, Z.; Kalman, F. K.; Barriada, J. L.; Esteban-Gomez, D.; Platas-Iglesias, C.; Toth, I.; Brucher, E.; Tircso, G., Taking the next step toward inert Mn²⁺ complexes of open-chain ligands: the case of the rigid PhDTA ligand. *New J. Chem.* **2018**, 42 (10), 8001-8011.
93. Laine, S.; Bonnet, C. S.; Kalman, F. K.; Garda, Z.; Pallier, A.; Caille, F.; Suzenet, F.; Tircso, G.; Toth, E., Mn²⁺ complexes of open-chain ligands with a pyridine backbone: less donor atoms lead to higher kinetic inertness. *New J. Chem.* **2018**, 42 (10), 8012-8020.
94. Gale, E. M.; Wey, H.-Y.; Ramsay, I.; Yen, Y.-F.; Sosnovik, D. E.; Caravan, P., A Manganese-based Alternative to Gadolinium: Contrast-enhanced MR Angiography, Excretion, Pharmacokinetics, and Metabolism. *Radiology* **2018**, 286 (3), 877-884.
95. Erstad, D. J.; Ramsay, I. A.; Jordan, V. C.; Sojoodi, M.; Fuchs, B. C.; Tanabe, K. K.; Caravan, P.; Gale, E. M., Tumor Contrast Enhancement and Whole-Body Elimination of the Manganese-Based Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent Mn-PyC3A. *Investigative radiology* **2019**, 54 (11), 697-703.
96. Wang, J.; Wang, H.; Ramsay, I. A.; Erstad, D. J.; Fuchs, B. C.; Tanabe, K. K.; Caravan, P.; Gale, E. M., Manganese-Based Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging of Liver Tumors: Structure-Activity Relationships and Lead Candidate Evaluation. *Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, 61 (19), 8811-8824.
97. Regueiro-Figueroa, M.; Rolla, G. A.; Esteban-Gomez, D.; de Blas, A.; Rodriguez-Blas, T.; Botta, M.; Platas-Iglesias, C., High Relaxivity Mn²⁺-Based MRI Contrast Agents. *Chemistry - A European Journal* **2014**, 20 (52), 17300-17305.

98. Phukan, B.; Mukherjee, C.; Goswami, U.; Sarmah, A.; Mukherjee, S.; Sahoo, S. K.; Moi, S. C., A New Bis(aquated) High Relaxivity Mn(II) Complex as an Alternative to Gd(III)-Based MRI Contrast Agent. *Inorganic Chemistry* **2018**, *57* (5), 2631-2638.
99. Geraldès, C. F. G. C.; Sherry, A. D.; Brown, R. D., III; Koenig, S. H., Magnetic Field Dependence of Solvent Proton Relaxation Rates Induced by Gd³⁺ and Mn²⁺ Complexes of Various Polyaza Macrocyclic Ligands: Implications for NMR Imaging. *Magnetic Resonance in Medicine* **1986**, *3*, 242-250.
100. Patinec, V.; Rolla, G. A.; Botta, M.; Tripier, R.; Esteban-Gomez, D.; Platas-Iglesias, C., Hyperfine Coupling Constants on Inner-Sphere Water Molecules of a Triazacyclononane-based Mn(II) Complex and Related Systems Relevant as MRI Contrast Agents. *Inorganic Chemistry* **2013**, *52* (19), 11173-11184.
101. de Sa, A.; Bonnet, C. S.; Geraldès, C.; Toth, E.; Ferreira, P. M. T.; Andre, J. P., Thermodynamic stability and relaxation studies of small, triaza-macrocyclic Mn(II) chelates. *Dalton Transactions* **2013**, *42* (13), 4522-4532.
102. Molnar, E.; Camus, N.; Patinec, V.; Rolla, G. A.; Botta, M.; Tircso, G.; Kalman, F. K.; Fodor, T.; Tripier, R.; Platas-Iglesias, C., Picolinate-containing macrocyclic Mn²⁺ complexes as potential MRI contrast agents. *Inorganic Chemistry* **2014**, *53* (10), 5136-49.
103. 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* (9), 1945-1951.
104. Artali, R.; Baranyai, Z.; Botta, M.; Giovenzana, G. B.; Maspero, A.; Negri, R.; Palmisano, G.; Sisti, M.; Tollari, S., Solution thermodynamics, computational and relaxometric studies of ditopic DO3A-based Mn(ii) complexes. *New J. Chem.* **2015**, *39* (1), 539-547.
105. Garda, Z.; Forgacs, A.; Do, Q. N.; Kalman, F. K.; Timari, S.; Baranyai, Z.; Tei, L.; Toth, I.; Kovacs, Z.; Tircso, G., Physico-chemical properties of Mn(II) complexes formed with cis- and trans-DO2A: thermodynamic, electrochemical and kinetic studies. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2016**, *163*, 206-213.
106. Rolla, G.; De Biasio, V.; Giovenzana, G. B.; Botta, M.; Tei, L., Supramolecular assemblies based on amphiphilic Mn(2+)-complexes as high relaxivity MRI probes. *Dalton Transactions* **2018**, *47* (31), 10660-10670.
107. Lieb, D.; Friedel, F. C.; Yawer, M.; Zahl, A.; Khusniyarov, M. M.; Heinemann, F. W.; Ivanovic-Burmazovic, I., Dinuclear seven-coordinate Mn(II) complexes: effect of manganese(II)-hydroxo species on water exchange and superoxide dismutase activity. *Inorganic Chemistry* **2013**, *52* (1), 222-36.
108. Shazeeb, M. S.; Feula, G.; Bogdanov, A., Jr., Liposome-encapsulated superoxide dismutase mimetic: theranostic potential of an MR detectable and neuroprotective agent. *Contrast Media & Molecular Imaging* **2014**, *9* (3), 221-8.
109. Kalman, F. K.; Tircso, G., Kinetic Inertness of the Mn²⁺ Complexes Formed with AAZTA and Some Open-Chain EDTA Derivatives. *Inorganic Chemistry* **2012**, *51* (19), 10065-10067.
110. Garda, Z.; Molnar, E.; Kalman, F. K.; Botar, R.; Nagy, V.; Baranyai, Z.; Brucher, E.; Kovacs, Z.; Toth, I.; Tircso, G., Effect of the Nature of Donor Atoms on the Thermodynamic, Kinetic and Relaxation Properties of Mn(II) Complexes Formed With Some Trisubstituted 12-Membered Macrocyclic Ligands. *Frontiers in Chemistry* **2018**, *6*, 232.
111. Bianchi, A.; Calabi, L.; Giorgi, C.; Losi, P.; Mariani, P.; Palano, D.; Paoli, P.; Rossi, P.; Valtancoli, B., Thermodynamic and structural aspects of manganese(II) complexes with polyaminopolycarboxylic ligands based upon 1,4,7,10-tetraazacyclododecane (cyclen). Crystal structure of dimeric [MnL]₂·2CH₃OH containing the new ligand 1,4,7,10-tetraaza-cyclododecane-1,4-diacetate. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **2001**, 917-922.

Introduction générale

112. Wahsner, J.; Gale, E. M.; Rodríguez-Rodríguez, A.; Caravan, P., Chemistry of MRI Contrast Agents: Current Challenges and New Frontiers. *Chemical Reviews* **2019**, *119* (2), 957-1057.
113. Hingorani, D. V.; Bernstein, A. S.; Pagel, M. D., A review of responsive MRI contrast agents: 2005–2014. *Contrast Media & Molecular Imaging* **2015**, *10* (4), 245-265.
114. Pinto, S. M.; Tomé, V.; Calvete, M. J. F.; Castro, M. M. C. A.; Tóth, É.; Geraldes, C. F. G. C., Metal-based redox-responsive MRI contrast agents. *Coordination Chemistry Reviews* **2019**, *390*, 1-31.
115. Lacerda, S., Targeted Contrast Agents for Molecular MRI. *Inorganics* **2018**, *6* (4), 129.
116. Tóth, É.; Bonnet, S. C., Responsive ParaCEST Contrast Agents. *Inorganics* **2019**, *7* (5), 68.
117. Zhang, R.; Yong, J.; Yuan, J.; Ping Xu, Z., Recent advances in the development of responsive probes for selective detection of cysteine. *Coordination Chemistry Reviews* **2020**, *408*, 213182.
118. Schafer, F. Q.; Buettner, G. R., Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine* **2001**, *30* (11), 1191-1212.
119. Aime, S.; Botta, M.; Gianolio, E.; Terreno, E., A p(O₂)-Responsive MRI Contrast Agent Based on the Redox Switch of Manganese(II / III) – Porphyrin Complexes. *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, *39* (4), 747-750.
120. Pinto, S. M. A.; Calvete, M. J. F.; Ghica, M. E.; Soler, S.; Gallardo, I.; Pallier, A.; Laranjo, M. B.; Cardoso, A. M. S.; Castro, M. M. C. A.; Brett, C. M. A.; Pereira, M. M.; Tóth, É.; Geraldes, C. F. G. C., A biocompatible redox MRI probe based on a Mn(ii)/Mn(iii) porphyrin. *Dalton Transactions* **2019**, *48* (10), 3249-3262.
121. Gale, E. M.; Mukherjee, S.; Liu, C.; Loving, G. S.; Caravan, P., Structure–Redox–Relaxivity Relationships for Redox Responsive Manganese-Based Magnetic Resonance Imaging Probes. *Inorganic Chemistry* **2014**, *53* (19), 10748-10761.
122. Yu, M.; Beyers, R. J.; Gorden, J. D.; Cross, J. N.; Goldsmith, C. R., A Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent Capable of Detecting Hydrogen Peroxide. *Inorganic Chemistry* **2012**, *51* (17), 9153-9155.
123. Yu, M.; Ambrose, S. L.; Whaley, Z. L.; Fan, S.; Gorden, J. D.; Beyers, R. J.; Schwartz, D. D.; Goldsmith, C. R., A mononuclear manganese(II) complex demonstrates a strategy to simultaneously image and treat oxidative stress. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (37), 12836-9.
124. Yu, M.; Ward, M. B.; Franke, A.; Ambrose, S. L.; Whaley, Z. L.; Bradford, T. M.; Gorden, J. D.; Beyers, R. J.; Cattley, R. C.; Ivanović-Burmazović, I.; Schwartz, D. D.; Goldsmith, C. R., Adding a Second Quinol to a Redox-Responsive MRI Contrast Agent Improves Its Relaxivity Response to H₂O₂. *Inorganic Chemistry* **2017**, *56* (5), 2812-2826.
125. Lee, T.; Zhang, X.-a.; Dhar, S.; Faas, H.; Lippard, S. J.; Jasanoff, A., In Vivo Imaging with a Cell-Permeable Porphyrin-Based MRI Contrast Agent. *Chemistry & Biology* **2010**, *17* (6), 665-673.
126. Zhang, X.-a.; Lovejoy, K. S.; Jasanoff, A.; Lippard, S. J., Water-soluble porphyrins as a dual-function molecular imaging platform for MRI and fluorescence zinc sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104* (26), 10780.
127. Barandov, A.; Bartelle, B. B.; Williamson, C. G.; Loucks, E. S.; Lippard, S. J.; Jasanoff, A., Sensing intracellular calcium ions using a manganese-based MRI contrast agent. *Nature Communications* **2019**, *10* (1), 897.
128. Wan, S.-S.; Cheng, Q.; Zeng, X.; Zhang, X.-Z., A Mn(III)-Sealed Metal–Organic Framework Nanosystem for Redox-Unlocked Tumor Theranostics. *ACS Nano* **2019**, *13* (6), 6561-6571.
129. Chen, J.; Zhang, W.-J.; Guo, Z.; Wang, H.-B.; Wang, D.-D.; Zhou, J.-J.; Chen, Q.-W., pH-Responsive Iron Manganese Silicate Nanoparticles as T₁-T₂* Dual-Modal Imaging Probes for Tumor Diagnosis. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2015**, *7* (9), 5373-5383.

130. Mi, P.; Kokuryo, D.; Cabral, H.; Wu, H.; Terada, Y.; Saga, T.; Aoki, I.; Nishiyama, N.; Kataoka, K., A pH-activatable nanoparticle with signal-amplification capabilities for non-invasive imaging of tumour malignancy. *Nature Nanotechnology* **2016**, *11* (8), 724-730.
131. Rolla, G. A.; Tei, L.; Fekete, M.; Arena, F.; Gianolio, E.; Botta, M., Responsive Mn(II) complexes for potential applications in diagnostic Magnetic Resonance Imaging. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19* (3), 1115-22.
132. Atanasijevic, T.; Zhang, X.-a.; Lippard, S. J.; Jasanoff, A., MRI Sensing Based on the Displacement of Paramagnetic Ions from Chelated Complexes. *Inorganic Chemistry* **2010**, *49* (6), 2589-2591.
133. You, Y.; Tomat, E.; Hwang, K.; Atanasijevic, T.; Nam, W.; Jasanoff, A. P.; Lippard, S. J., Manganese displacement from Zinpyr-1 allows zinc detection by fluorescence microscopy and magnetic resonance imaging. *Chemical Communications* **2010**, *46* (23), 4139-4141.
134. Mannich, C.; Mohs, P., Über Derivate eines aus zwei Piperidinringen kondensierten bicyclischen Systems. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **1930**, *63* (3), 608-612.
135. Plas, A.; Marchand, F.; Eschalièr, A.; Troin, Y.; Chalard, P., Stereoselective Synthesis and In Vivo Evaluation of the Analgesic Activity of Polysubstituted Bispidines. *European Journal of Organic Chemistry* **2012**, *2012* (30), 6070-6079.
136. Jeyaraman, R.; Avila, S., Chemistry of 3-azabicyclo[3.3.1]nonanes. *Chemical Reviews* **1981**, *81* (2), 149-174.
137. Wang, Z.; Islam, M. J.; Vukotic, V. N.; Revington, M. J., Conformational Study of N,N'-Diacyl Bispidines and Dioxo Bis-bispidines: Planar Chirality and Molecular Switching. *The Journal of Organic Chemistry* **2016**, *81* (7), 2981-2986.
138. Norrehed, S.; Erdélyi, M.; Light, M. E.; Gogoll, A., Protonation-triggered conformational modulation of an N,N'-dialkylbispidine: first observation of the elusive boat-boat conformer. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2013**, *11* (37), 6292-6299.
139. Misra, A.; Anil Kumar, K. S.; Jain, M.; Bajaj, K.; Shandilya, S.; Srivastava, S.; Shukla, P.; Barthwal, M. K.; Dikshit, M.; Dikshit, D. K., Synthesis and evaluation of dual antiplatelet activity of bispidine derivatives of N-substituted pyroglutamic acids. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *110*, 1-12.
140. Smisman, E. E.; Ruenitz, P. C., 7-Aza analogs of the analgetic agent azabicyclane. Synthesis and pharmacologic analysis. *Journal of Medicinal Chemistry* **1976**, *19* (1), 184-186.
141. Li, G.; Liu, M.; Zou, S.; Feng, X.; Lin, L., A Bispidine-Based Chiral Amine Catalyst for Asymmetric Mannich Reaction of Ketones with Isatin Ketimines. *Organic Letters* **2020**, *22* (21), 8708-8713.
142. Comba, P.; Nuber, B.; Ramlow, A., The design of a new type of very rigid tetradentate ligand. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1997**, (3), 347-352.
143. Comba, P.; Morgen, M.; Wadepohl, H., First row transition metal complexes of a hexadentate pyrazole-based bispidine ligand. *Polyhedron* **2013**, *52*, 1239-1245.
144. Comba, P.; Rudolf, H.; Wadepohl, H., Synthesis and transition metal coordination chemistry of a novel hexadentate bispidine ligand. *Dalton Transactions* **2015**, *44* (6), 2724-2736.
145. Comba, P.; Grimm, L.; Orvig, C.; Rück, K.; Wadepohl, H., Synthesis and Coordination Chemistry of Hexadentate Picolinic Acid Based Bispidine Ligands. *Inorganic Chemistry* **2016**, *55* (24), 12531-12543.
146. Comba, P.; Starke, M.; Wadepohl, H., Optimization of Hexadentate Bispidine Ligands as Chelators for ⁶⁴CuII PET Imaging. *ChemPlusChem* **2018**, *83* (7), 597-604.

Introduction générale

147. Medved'ko, A. V.; Egorova, B. V.; Komarova, A. A.; Rakhimov, R. D.; Krut'ko, D. P.; Kalmykov, S. N.; Vatsadze, S. Z., Copper–Bispidine Complexes: Synthesis and Complex Stability Study. *ACS Omega* **2016**, *1* (5), 854-867.
148. Brox, D.; Comba, P.; Herten, D.-P.; Kimmle, E.; Morgen, M.; Rühl, C. L.; Rybina, A.; Stephan, H.; Storch, G.; Wadepohl, H., CuII-selective bispidine–dye conjugates. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2015**, *148*, 78-83.
149. Roux, A.; Gillet, R.; Huclier-Markai, S.; Ehret-Sabatier, L.; Charbonnière, L. J.; Nonat, A. M., Bifunctional bispidine derivatives for copper-64 labelling and positron emission tomography. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2017**, *15* (6), 1475-1483.
150. Singh, G.; Zarschler, K.; Hunoldt, S.; Martínez, I. I. S.; Ruehl, C. L.; Matterna, M.; Bergmann, R.; Máthé, D.; Hegedüs, N.; Bachmann, M.; Comba, P.; Stephan, H., Versatile Bispidine-Based Bifunctional Chelators for ⁶⁴CuII-Labeling of Biomolecules. *Chemistry – A European Journal* **2020**, *26* (9), 1989-2001.
151. Choudhary, N.; Dimmling, A.; Wang, X.; Southcott, L.; Radchenko, V.; Patrick, B. O.; Comba, P.; Orvig, C., Octadentate Oxine-Armed Bispidine Ligand for Radiopharmaceutical Chemistry. *Inorganic Chemistry* **2019**, *58* (13), 8685-8693.
152. Comba, P.; Jermilova, U.; Orvig, C.; Patrick, B. O.; Ramogida, C. F.; Rück, K.; Schneider, C.; Starke, M., Octadentate Picolinic Acid-Based Bispidine Ligand for Radiometal Ions. *Chemistry – A European Journal* **2017**, *23* (63), 15945-15956.
153. 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* (3), 896-901.

*Chapitre 2 : Caractérisation du complexe
 $\text{Mn}(\text{L}^1)$ hautement inerte*

Introduction

Pour les complexes de Mn^{2+} conçus ces dernières décennies en tant qu'agent de contraste potentiel en Imagerie par Résonance Magnétique, la modestie de l'inertie constitue le principal point faible.¹⁻³ En effet, mis à part l'efficacité, définie par la relaxivité, l'inertie représente un paramètre capital. L'inertie des complexes métalliques devient d'autant plus importante que leur stabilité quand des applications *in vivo* sont envisagées. L'inertie des complexes de Mn^{2+} est plus faible que celle des chélates de Gd^{3+} par le manque d'énergie de stabilisation du champ cristallin, due à la configuration électronique d^5 du Mn^{2+} . Dues aux taille et charge relativement petites du cation, généralement, il ne peut former que typiquement 6 ou 7 liaisons (contrairement à 9 pour le Gd^{3+}), dont l'une représente celle établie avec la molécule d'eau. Par conséquent, la structure du ligand jouera un rôle déterminant dans l'inertie du complexe.

Dans ce contexte, en collaboration avec l'équipe du Dr. Loïc Charbonnière et du Dr. Aline Nonat de l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC) de Strasbourg, nous avons étudié un complexe de Mn^{2+} , basé sur un ligand de type bispidine penta-denté (**L**¹), doté d'une structure pré-organisée et rigide (figure 2.1).

Il s'agit d'un ligand bifonctionnel qui porte un groupement lysine afin de permettre ultérieurement le couplage de différentes unités de ciblage biologique. Ce même ligand a été précédemment étudié par nos collaborateurs pour divers ciblage, ainsi que pour la complexation de différents métaux dans le contexte d'imagerie nucléaire. La molécule a été couplée à un peptide modèle (GP120) et à la biotine. Sa radiocomplexation au $^{64}Cu^{2+}$ a été réalisée avec un rendement de 90 % en 5 minutes.⁴ Plus récemment, **L**¹ a été couplé avec une porphyrine et radiomarké avec du $^{68}Ga^{3+}$ pour des applications combinées en tomographie par émission de positons (TEP) et en thérapie photodynamique. Malgré le fait que cette bispidine soit un ligand penta-denté et donc pas parfaitement adapté pour la complexation du Ga^{3+} qui nécessite une hexa-coordination, le complexe [$^{68}Ga(L^1)$] reste stable dans le sérum pendant plus de deux heures⁵ et il a été conclu que cela peut être adapté au temps de demi-vie de cet isotope. Pour enrichir le champ d'applications, nous avons étudié ce ligand pour la complexation du Mn^{2+} en visant une application en imagerie bimodale IRM/TEP.

Caractérisation du complexe $[Mn(L^1)]$ hautement inerte

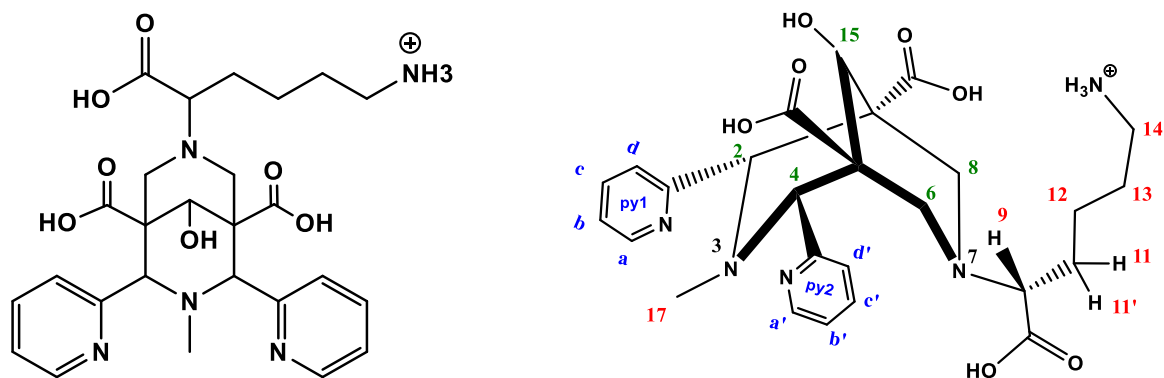


Figure 2.1 : Représentation 2 et 3D du ligand L^1 étudié.

1. Synthèse

1.1. Synthèse du ligand L^1

La synthèse du ligand a été entièrement réalisée par nos collaborateurs à Strasbourg.

La bispidine L^1 est obtenue en quatre étapes à partir du précurseur pipéridinone P_1 (figure 2.2).⁶

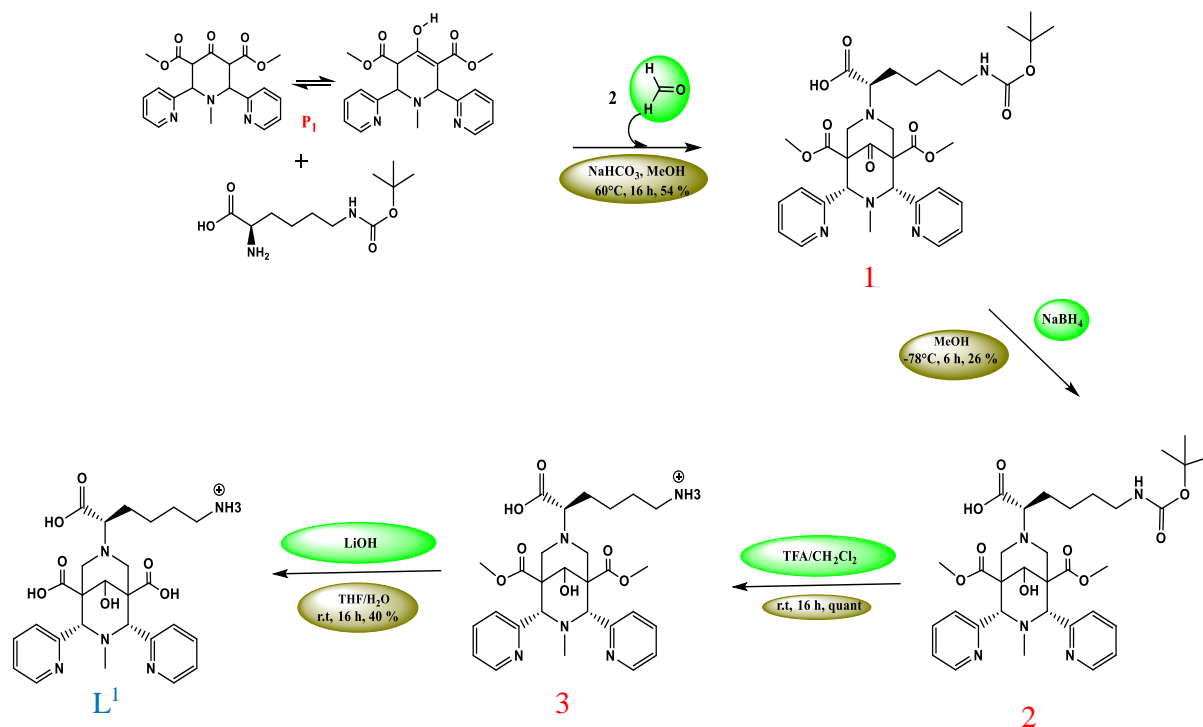


Figure 2.2 : Schéma de synthèse de la bispidine L^1 .

La première étape qui mène à la formation de la bispidone (1), se base sur une réaction de type double Mannich, mettant en jeu un ratio équimolaire du précurseur pipéridinone (P_1) et de l'acide aminé (L-lysine), auquel la fonction amine portée par la chaîne lysine est protégée par un groupement BOC : N- ϵ -(*tert*-butoxycarbonyl)-L-lysine et environ trois équivalents de formaldéhyde.

La réaction se fait dans un milieu polaire protique sous reflux à 60 °C, pendant 16 h, au bout duquel la solution est filtrée et le solvant évaporé sous vide. Le solide obtenu est dissous dans un peu de méthanol, puis on rajoute quelques gouttes d'éther d'éthyle pour faire précipiter le composé, et ce dernier est récupéré par centrifugation. L'ion hydrogénocarbonate, amphotère, utilisé lors de cette étape permet de faciliter la déprotonation de l'amine de la L-lysine.

Le bispidol (2) est obtenu suite à une réaction de réduction sélective de la fonction cétone en tête de pont de la bispidone (1), avec la fonction hydroxyle pointant vers l'azote N^3 . La réaction se déroule en milieu polaire protique, en présence de $NaBH_4$, à basse température (-78 °C), pendant 6 h, avec un rendement de 26 %. Le bispidol (2) est purifié par chromatographie flash, à phase inverse.

La déprotection de l'amine de la chaîne lysine est réalisée en présence de TFA, en milieu polaire aprotique, pendant 16 h, à température ambiante. La réaction est quantitative et donne le bispidol (3).

La dernière étape est une réaction de saponification qui donne la bispidine L^1 au bout de 16 h, à température ambiante, avec un rendement de 40 %.

1.2. Etude RMN du ligand L^1

Pour une bonne complexation des métaux de transition, et plus particulièrement du Mn^{2+} , la bispidine L^1 doit adopter la conformation de type chaise-chaise avec une position relative en *cis* des pyridines portées par C2 et C4. Afin de confirmer la conformation chaise-chaise du bicyclic décrite dans la littérature et l'obtention d'un composé énantiopur, nous avons réalisé une étude RMN sur la bispidine L^1 dans du D_2O , à 700 MHz, pH 7 (pD 7,41).

La figure 2.3 met en évidence l'obtention d'une bispidine (L^1) énantiopure, par le biais de la chaîne lysine qui porte un centre de chiralité au niveau du carbone C9. En effet, nous observons un dédoublement des protons méthylènes H11 et H11' portés par le carbone adjacent au centre de chiralité (C11) d'où le signal de deux protons diastéréotopes du spectre HSQC (figure 2.4.b).

Caractérisation du complexe $[\text{Mn}(\text{L}^1)]$ hautement inerte

Dans la gamme des déplacements chimiques $\sim 1,5\text{-}2,2$ ppm, nous observons les protons méthylènes de la chaîne lysine à l'exception de ceux des protons 9 et 14 dont le déplacement chimique est respectivement 3,58 ppm (multiplet) et 3,05 ppm (triplet). Le spectre TOCSY (figure 2.4.a) met en évidence le couplage scalaire ($^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$) de ces protons. Dans cette même gamme (à 2,01 ppm) apparaissent également les protons du groupement méthyle porté par l'azote N3 (singulet).

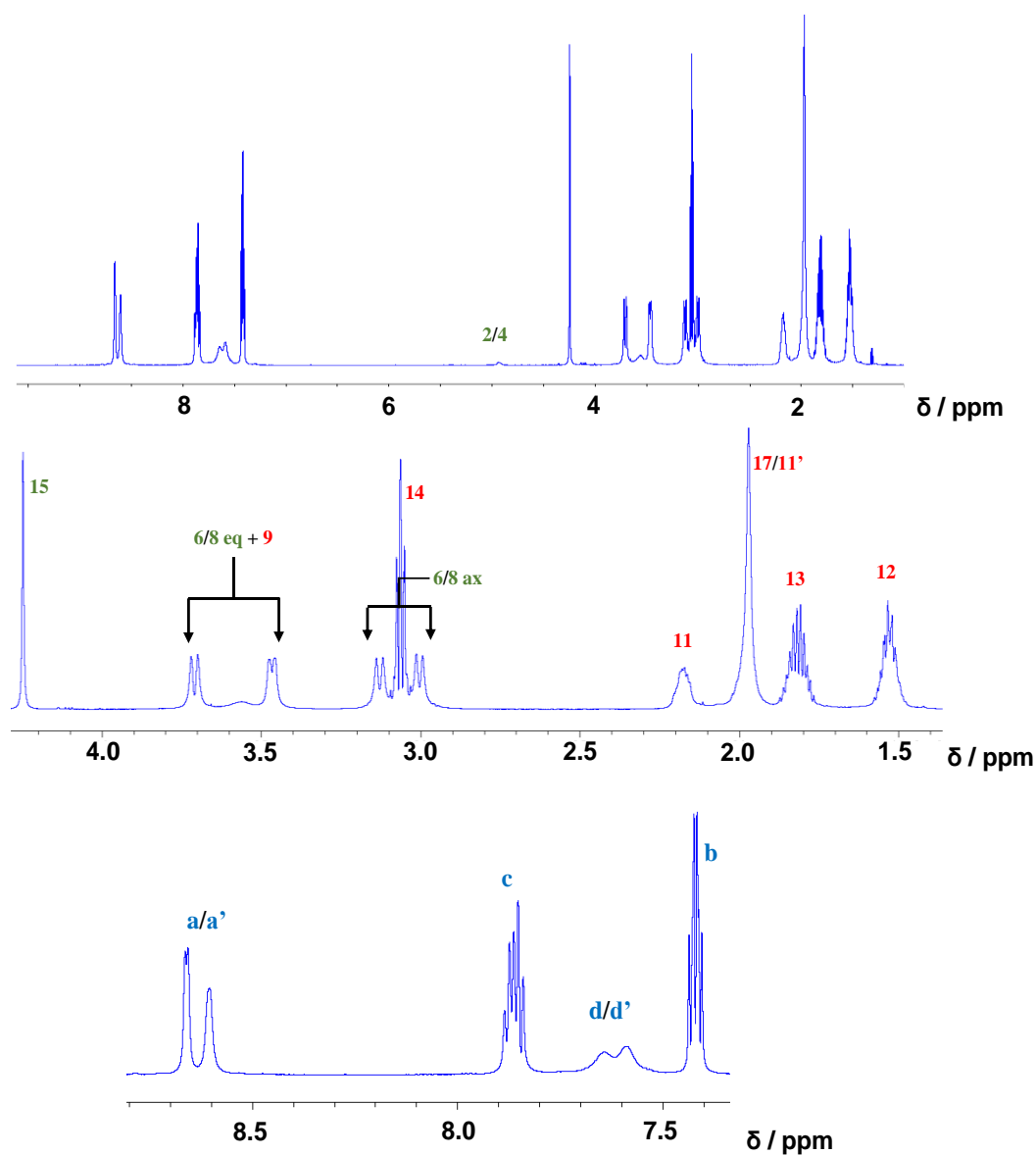


Figure 2.3 : Spectre RMN ^1H de la bispidine L^1 dans du D_2O , pH 7 (pD 7,41), 700 MHz.

On observe un système AX pour les protons H^6 et H^8 du bicyclic, comme en témoigne la figure 2.4, suggérant une rigidité du cycle pipéridine qui porte l'azote N7.

En effet, on n'observe pas un couplage de second ordre (effet de toit), mais plutôt un couplage de premier ordre entre les protons axiaux et équatoriaux (figure 2.3). A noter que les effets de second ordre ne sont visibles que si la valeur du rapport $\Delta\nu/J$ est inférieure à 10, avec $\Delta\nu$ correspondant à la différence de fréquence entre les deux parties du système AX, et J à la constante de couplage des protons H_{eq} et H_{ax} .

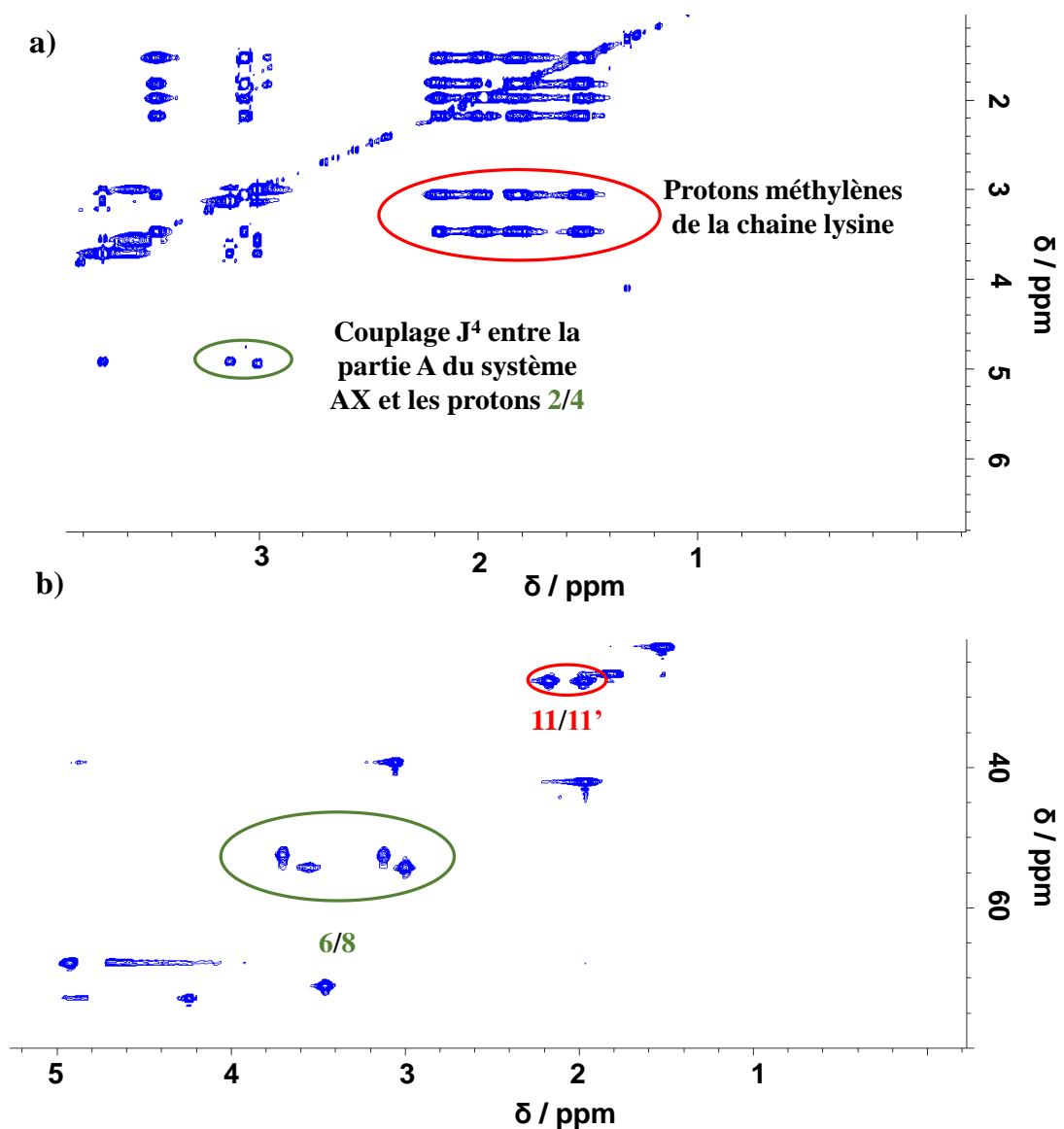


Figure 2.4 : a) Spectre TOCSY 1H - 1H ; b) Spectre HSQC 1H - ^{13}C de la bispidine L^1 (D_2O), pH 7 (pD 7,41), 700 MHz.

Caractérisation du complexe $[Mn(L^1)]$ hautement inerte

Pour des protons portés par des cycles saturés, avec des contraintes cycliques, on peut observer un couplage scalaire J^4 , correspondant principalement dans le cas des bispidines à deux types de configurations géométriques : W et U, observable via le spectre TOCSY. Ce phénomène est dû à l'alignement adéquat des orbitales des liaisons C-H et C-C. Ainsi, la figure 2.4-a met en évidence le couplage scalaire J^4 qui existe entre les protons 2 ou 4 en position axiale et ceux de la partie A en position axiale du système AX ($H^{6/8ax}$). En conséquence, on conclut une configuration de type W, qui est souvent considérée comme une des caractéristiques d'une conformation chaise-chaise de la bispidine. Les protons conduisant à ce couplage sont illustrés sur la figure 2.5.

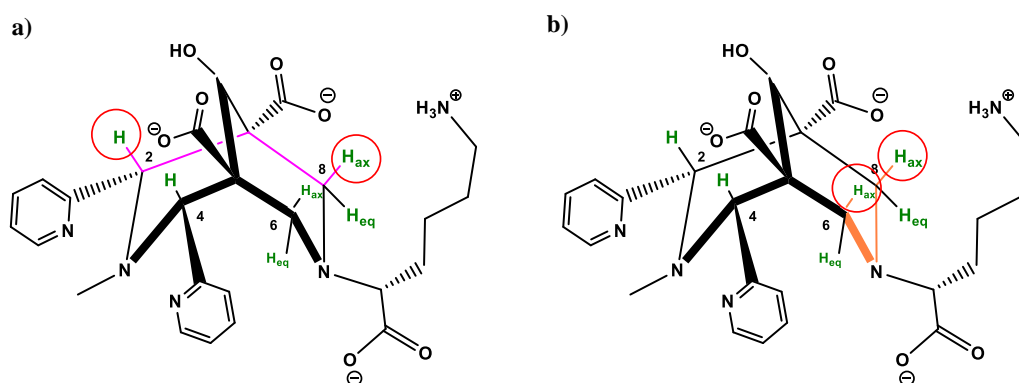


Figure 2.5 : a) Configuration géométrique W observée en TOCSY ; b) Configuration géométrique U.

La position axiale des protons H^2 et H^4 implique que les deux pyridines sont forcément en position équatoriale. La figure 2.6. révèle leur non-équivalence. Dans la gamme de déplacement chimique allant de 7,4 à 8,8 ppm, nous détectons des protons aromatiques. Les spectres HSQC et TOCSY montrent des signaux distincts pour a/a' et d/d' , respectivement en position alpha et epsilon de l'azote de la pyridine, ce qui suggère leur non-équivalence et confirme de nouveau la présence d'un composé énantiopur, avec comme conséquence la dissymétrie du ligand L^1 .

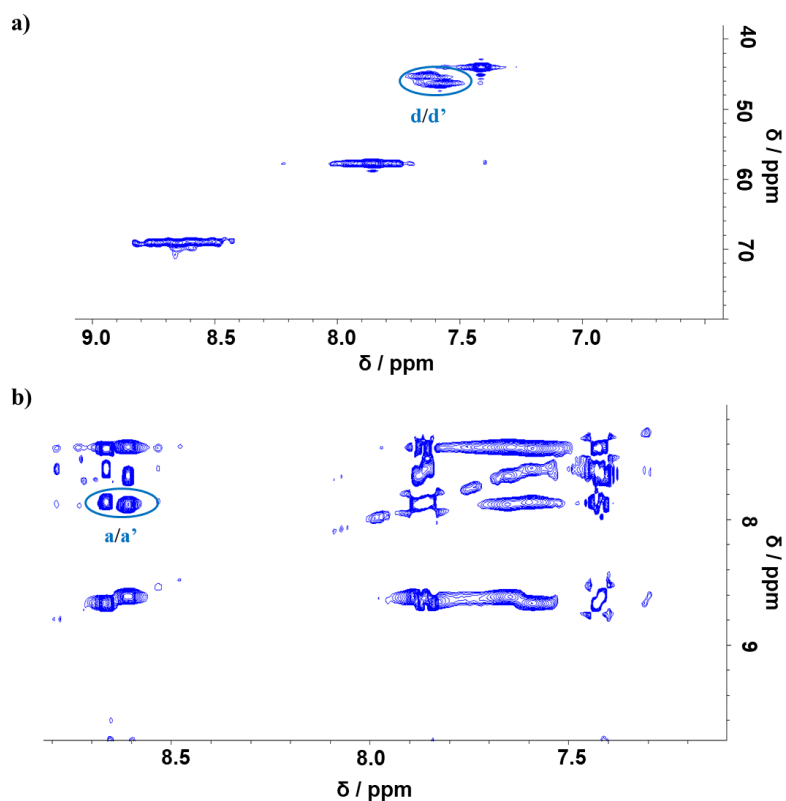


Figure 2.6 : a) Spectre HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$; b) Spectre TOCSY $^1\text{H}-^1\text{H}$ de la bispidine L^1 (D_2O), pH 7 (pD 7,41), 700 MHz.

A cause de cette dissymétrie, c'est uniquement le proton d' de la pyridine 2 (qui se trouve du côté du carboxylate de la lysine) qui peut éventuellement former une liaison hydrogène avec l'oxygène du groupement carboxylate de la chaîne lysine (figure 2.7). En effet, les protons de la pyridine sont donneurs d'hydrogène⁶. Une telle liaison hydrogène, assistée aussi par la charge du carboxylate, impactera également les déplacements chimiques des protons de la pyridine 2 (mais pas ceux de la pyridine 1 qui se trouve en arrière du plan). La force de cette liaison dépendra de l'angle formé par les centres $[\text{C}_{\text{sp}2} - \text{H} \cdots \text{O}]^\#$, et de la distance qui sépare les atomes donneur et accepteur.

L'ensemble de ces résultats RMN confirme que la conformation chaise-chaise du ligand L^1 .

Caractérisation du complexe $[\text{Mn}(\text{L}^1)]$ hautement inerte

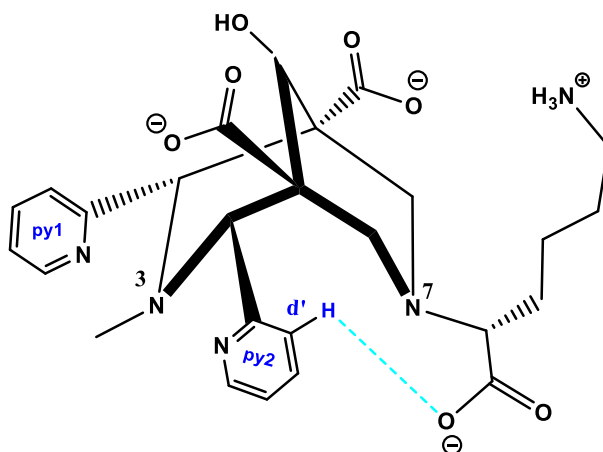


Figure 2.7 : Représentation de la bispidine L^1 illustrant une potentielle liaison hydrogène entre l'oxygène du carboxylate de la lysine et le proton d' de la pyridine (py 2).

1.3. Formation du complexe $[\text{Mn}(\text{L}^1)]^-$

Pour la complexation du Mn^{2+} par la bispidine L^1 , un suivi de la cinétique de formation a été fait à différents pH, afin de définir les conditions idéales de réaction et le temps nécessaire pour une complexation complète.

La figure 2.8 représente l'évolution de la relaxivité longitudinale dans une solution tamponnée de Mn^{2+} et L^1 en quantité équimolaire, en fonction du temps à différents pH, en milieux aqueux, à 25 °C. Ce suivi reflète l'évolution de la première sphère de coordination du Mn^{2+} , dans laquelle la substitution des molécules d'eau au profit des atomes donneurs de la bispidine a pour conséquence l'augmentation du temps de relaxation longitudinale paramagnétique ($T_{1\text{par}}$).

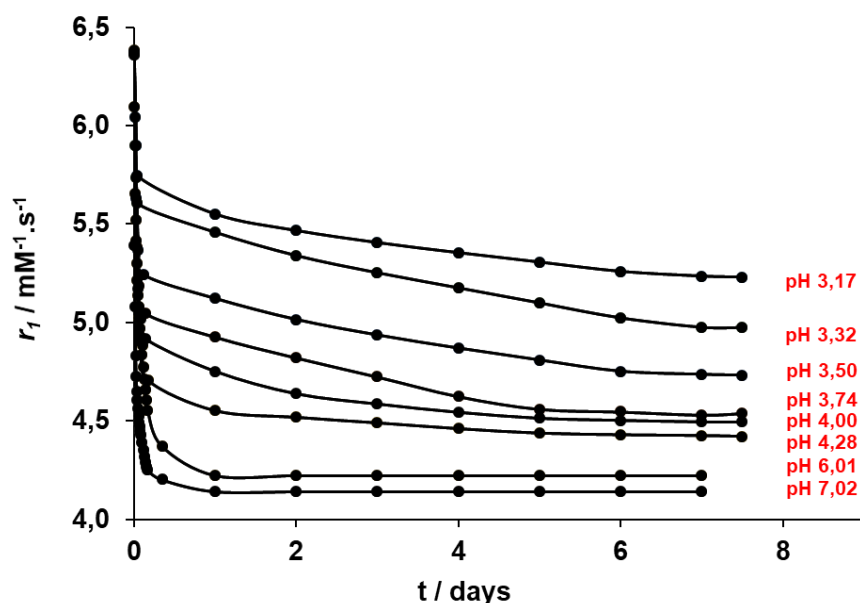


Figure 2.8 : Evolution de la relaxivité longitudinale en fonction du temps à différents pH dans une solution contenant un mélange équimolaire de Mn^{2+} et L^1 . $c = 1,5 \text{ mM}$; 60 MHz ; 25°C .

La durée de la complexation complète à pH 6 et 7 est estimée respectivement à 16 et 6 h. A pH acide, la complexation est beaucoup plus lente, il faut jusqu'à une semaine pour atteindre l'équilibre à pH 3,17 (complexation non-complète).

A cause de cette cinétique lente, pour toute utilisation lors des études de caractérisation et *in vivo*, le complexe $[Mn(L^1)]^-$ est préparé en mélangeant des quantités équimolaires de Mn^{2+} et de L^1 , à pH 7, 65°C , pendant 30 min. Le pH est régulièrement contrôlé et ajusté par l'addition d'une solution de base (KOH). Le complexe est toujours utilisé directement en solution, et ne sera pas récupéré sous forme solide.

La figure 2.9 ci-dessous représente l'équation de la réaction.

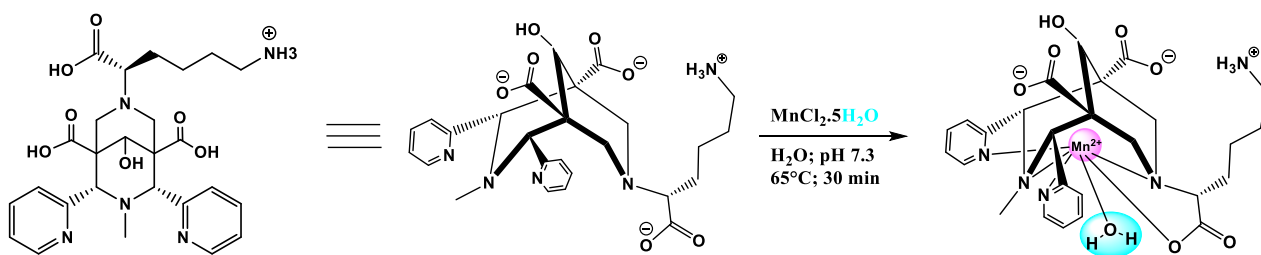


Figure 2.9 : Complexation du Mn^{2+} par la bispidine L^1 .

2. Stabilité du complexe $[Mn(L^1)]$

L'étude de la stabilité des complexes métalliques conçus pour des applications en imagerie médicale, plus particulièrement en IRM, est indispensable pour évaluer l'affinité du chélatant au métal paramagnétique et d'autres cations métalliques endogènes. En effet, une fois dans l'organisme, on peut avoir des réactions de transmétallation ou de transchélation induites respectivement par des cations et anions endogènes.

Pour évaluer la stabilité (constante de stabilité ($\log K_{ML}$) et stabilité conditionnelle exprimée par le $pM = -\log[M_{\text{libre}}]$ dans des conditions données) du complexe, on détermine dans un premier temps les constantes de protonation du ligand.

La figure 2.10 ci-dessous représente les structures des molécules comparées dans cette partie.

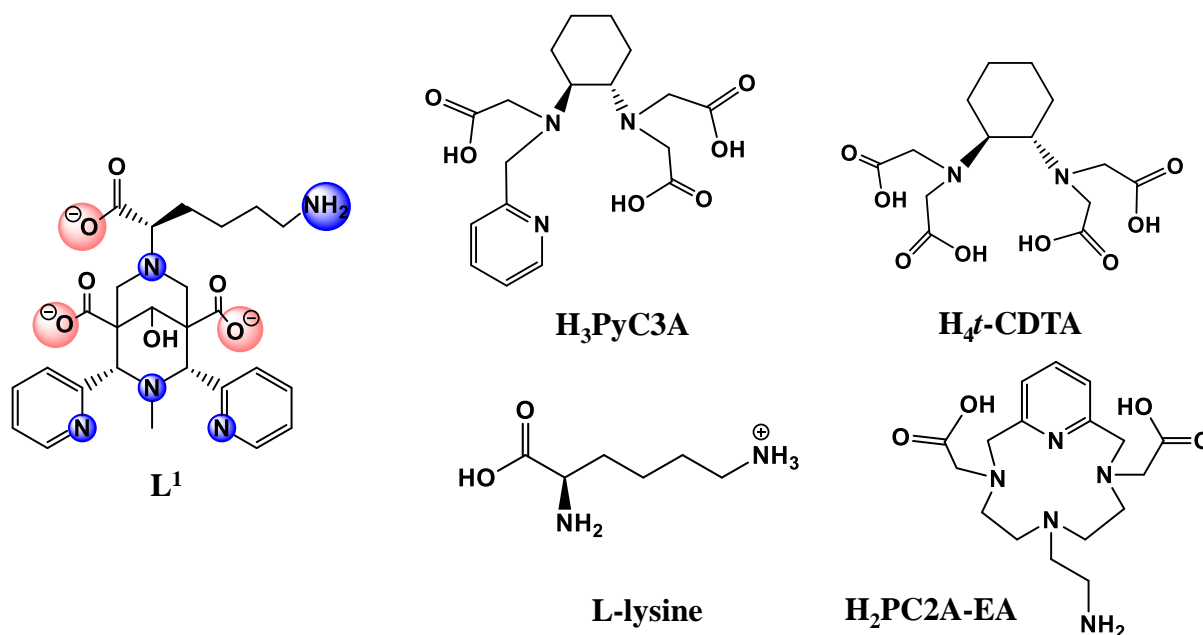


Figure 2.10 : Structures des molécules comparées.

2.1. Constantes de protonation de **L¹**

La bispidine **L¹**, de type polyaminocarboxylate, est potentiellement dotée de huit sites de protonation (figure 2.10). Cependant, quand la conformation du bicyclic est de type chaise-chaise, le nombre de sites de protonation passe à sept. En effet, seulement l'une des amines N3

ou N7 peut être protonée, et ce proton forme une liaison hydrogène très forte avec l'autre amine (formation d'un pseudo-cycle à six chaînons) empêchant la protonation de celle-ci.

Pour déterminer les constantes de protonation, un titrage pH-potentiométrique direct a été réalisé entre pH 2 et 12. La figure 2.11 représente la courbe de titrage pH-potentiométrique du ligand L¹.

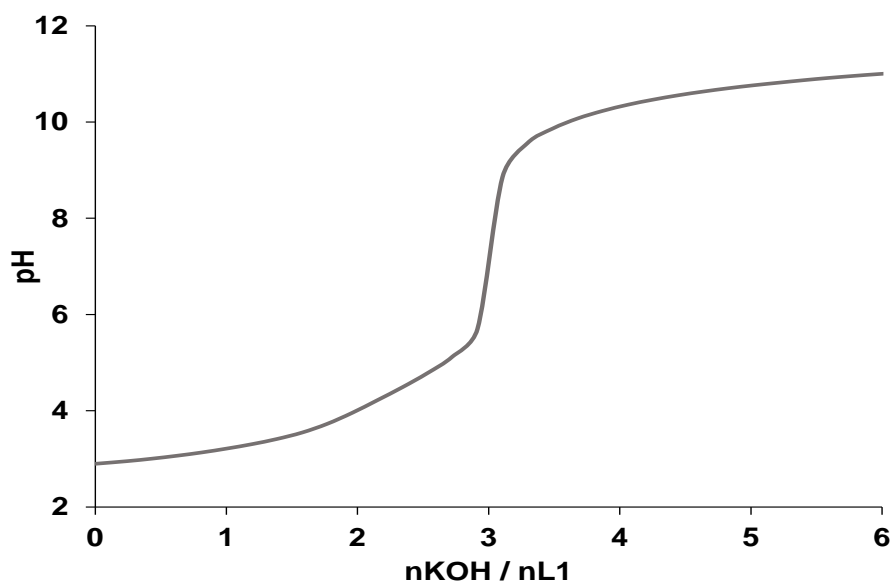


Figure 2.11 : Courbe de titrage du ligand L¹, $c_{L1} = 1,8 \text{ mM}$; $I = 0,15 \text{ M KCl}$, 25°C .

Les constantes de protonation du ligand L¹ entre pH 2 et 12 sont obtenues par des calculs via le logiciel Hyperquad 2008, en utilisant l'équation 2.1 Après analyse, on obtient cinq constantes de protonation (tableau 2.1).



$$K_{Hi} = \frac{[\text{LH}_i]}{[\text{LH}_{i-1}] \times [\text{H}^+]} \quad i = 1-5 \quad \text{équation 2.1}$$

Caractérisation du complexe $[\text{Mn}(\text{L}^1)]$ hautement inerte

Tableau 2.1 : Constantes de protonation du ligand L^1 et des ligands de comparaison.

	L^1	Lysine ⁷	PyC3A ¹	<i>t</i> CDTA ²	PC2A-EA ³
$\log K_{\text{H1}}$	11,44(1)	10,69	10,16	9,54	11,34
$\log K_{\text{H2}}$	10,31(2)	9,08	6,39	5,97	8,93
$\log K_{\text{H3}}$	4,71(5)	2,02	3,13	3,60	6,91
$\log K_{\text{H4}}$	2,76(5)	-	-	2,52	1,97
$\log K_{\text{H5}}$	2,22(4)	-	-	1,46	-
$\Sigma \log K_{\text{Hi}}$	31,44	21,79	19,68	23,09	18,25

Le ligand L^1 peut être considéré comme un dérivé de la L-lysine, avec l'azote de l'amine- α (N7), incorporé dans le bicyclic.

Par analogie au dérivé phosphonate précédemment étudié dans la littérature,⁴ la première constante de protonation ($\log K_{\text{H1}} = 11,44$) est attribuée à l'azote N3 du bicyclic, plus basique que le N7. Comme expliqué plus haut, une telle mono-protonation des azotes du bicyclic du fait de la formation d'un pont hydrogène (N3-H---N7) confirme la conformation chaise-chaise.⁸

La similitude de la deuxième constante de protonation ($\log K_{\text{H2}} = 10,31$) à celle de l'amine- ϵ de la L-lysine ($\log K_{\text{H1}} = 10,65^7$) nous permet de l'attribuer à l'azote de la chaîne lysine. Les trois autres constantes correspondent à la protonation des trois carboxylates du ligand.

Concernant les deux carboxylates portés par le noyau bicyclic, l'un est plus proche de l'alcool que l'autre. Celui-ci pourrait ainsi établir une liaison hydrogène avec l'alcool pour former un pseudo cycle à six chaînons qui renforce la stabilité du ligand. La mésomérie de la forme déprotonée du carboxylate renforce cette liaison hydrogène, qui conduit à une augmentation de l'acidité du carboxylate. Les constantes de protonation du salicylate ($\log K_{\text{H3}} = 2,98^9$) et du benzoate ($\log K_{\text{H3}} = 4,20^{10}$) illustrent ce phénomène (figure 2.12).

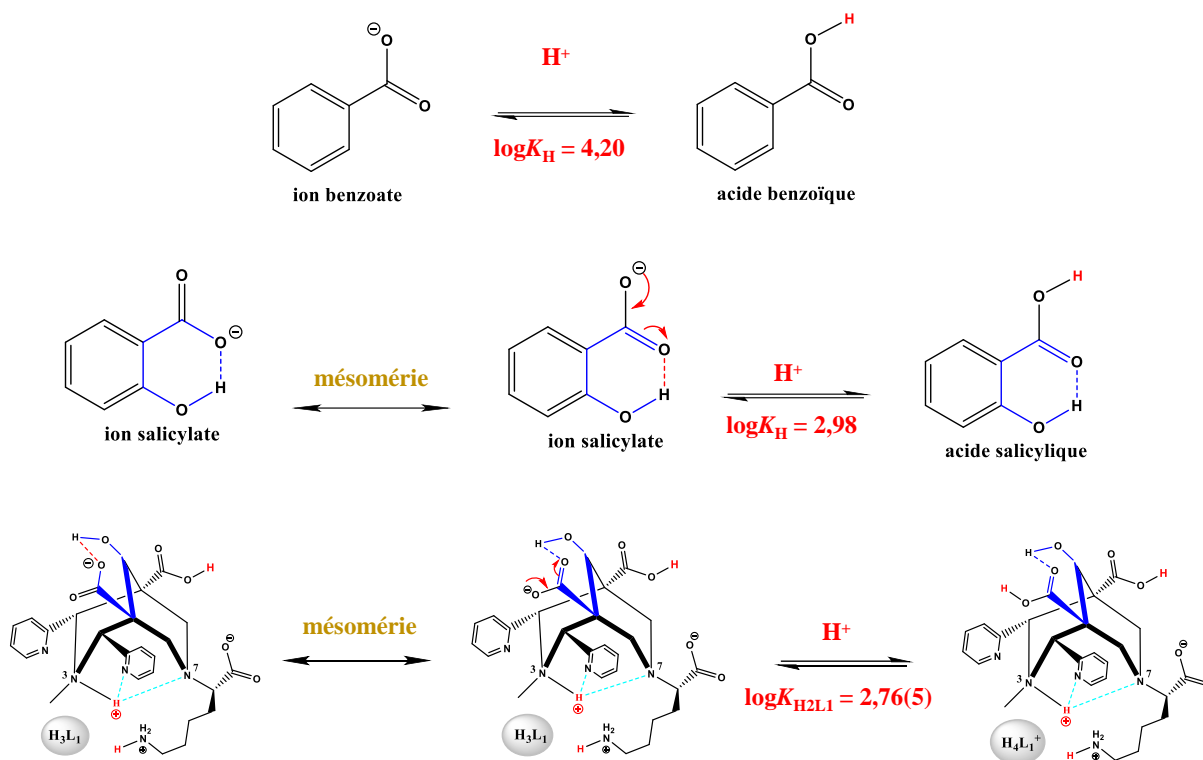


Figure 2.12 : Schéma illustratif de l'effet de la présence de l'alcool sur la protonation du carboxylate.

De ce fait, on pourrait attribuer la quatrième constante de protonation ($\log K_{H_4} = 2,76$) au carboxylate qui établirait une liaison hydrogène avec l'alcool et la troisième ($\log K_{H_3} = 4,71$) au carboxylate qui se trouve sur l'autre plan.

Les constantes de protonation des azotes des deux pyridines sont trop basses et ne sont pas accessibles par titrage pH-potentiométrique.

La figure 2.13 ci-dessous illustre les différents équilibres et espèces mises en jeu.

Caractérisation du complexe $[\text{Mn}(\text{L}^1)]$ hautement inerte

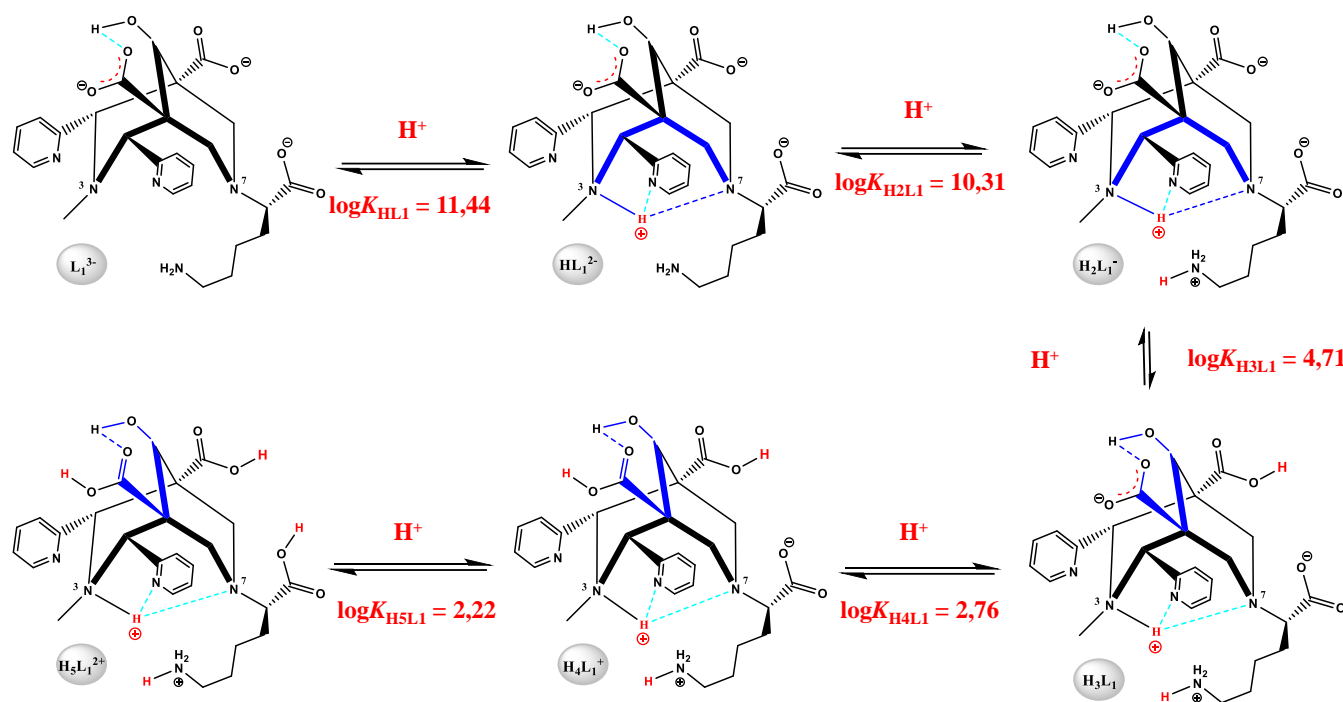


Figure 2.13 : Schéma illustratif des équilibres de protonation pour L^1 .

2.2. Constantes de stabilité des complexes $[\text{M}(\text{L}^1)]$

Pour évaluer la stabilité des complexes Mn/L^1 et Zn/L^1 , des titrages pH-potentiométriques ont aussi été effectués. Cependant, l'étude de la cinétique de formation de Mn/L^1 avait révélé une complexation lente, et de ce fait, on ne peut pas faire un titrage direct.

En revanche, la réaction de complexation du Zn^{2+} est rapide.

Pour le système Mn/L^1 , des batchs ont été réalisés entre pH 2,5 et 7 et leur évolution a été suivie par relaxométrie (en mesurant le temps de relaxation longitudinale en fonction du temps).

A l'équilibre, synonyme de non évolution du temps de relaxation longitudinale, on mesure le pH. En dessus de pH 7, un titrage direct a été réalisé, en partant du complexe déjà formé. La figure 2.14 ci-dessous représente les courbes de titrage de L^1 , Mn/L^1 et Zn/L^1 .

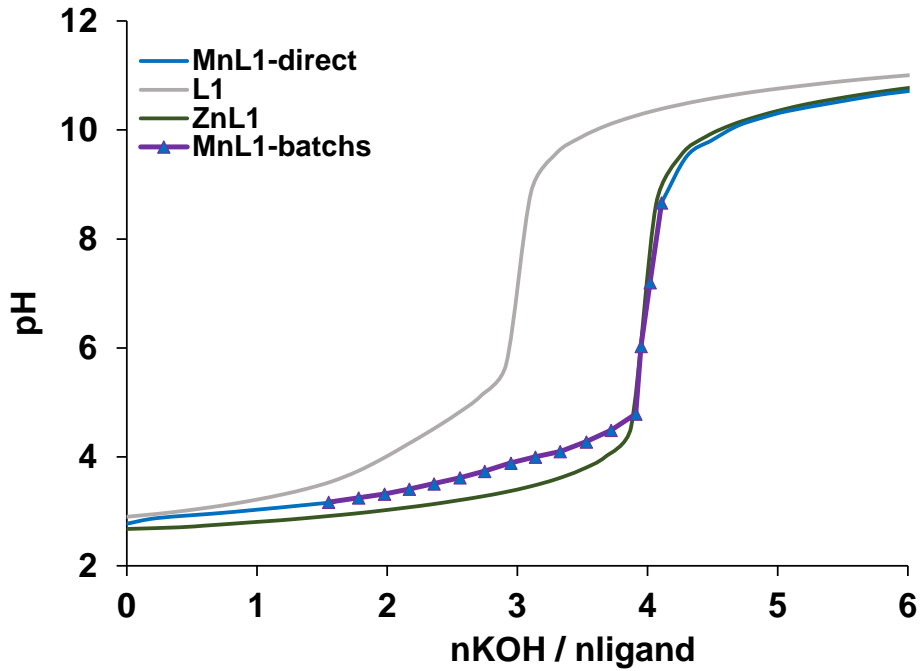
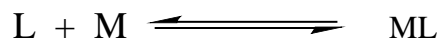
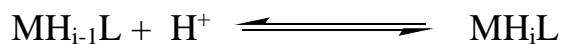


Figure 2.14 : Titration potentiométrique du ligand L^1 en absence et en présence des métaux Mn^{2+} et Zn^{2+} ; $c_{L1} = c_{Mn} = c_{Zn} = 1,8 \text{ mM}$; $I = 0,15 \text{ M KCl}$; 25°C .

De ces courbes de titrage, on note une différence d'un équivalent de proton au niveau des sauts de pH entre celle du ligand et des systèmes Mn/L^1 et Zn/L^1 , qui suggère que ces complexes sont mono-protonés entre pH 5 et 9, car le ligand a deux constantes de protonation à pH basique. Le tableau 2.2 ci-dessous représente les constantes de stabilité et de protonation des complexes, obtenues en utilisant l'équation 2.2 via le logiciel Hyperquad 2008.



$$K_{ML} = \frac{[ML]}{[M] \times [L]}$$



$$K_{MH_iL} = \frac{[MH_iL]}{M[H_{i-1}L] \times [H^+]}$$

équation 2.2

Caractérisation du complexe [Mn(L¹)] hautement inerte

Tableau 2.2 : Constantes de protonation des ligands et constantes de protonation et de stabilité des complexes.

	L ¹	Lysine ⁷	PyC3A ¹	tCDTA ²	PC2A-EA ³
logK_{MnL}	12,21(5)	-	14,14	14,32	19,01
logK _{MnHL}	10,42(3)	-	2,43	2,90	6,88
logK _{MnH2L}	3,87(4)	-	-	1,89	2,50
logK_{ZnL}	15,59(3)	-	-	16,75	-
logK _{ZnHL}	10,33(2)	-	-	2,57	-
logK _{ZnH2L}	3,28(1)	-	-	-	-
pMn^a	6,65	-	8,17	8,68	9,27
pZn^a	8,40	-	-	-	-

^a c_{Mn} = c_L = 10⁻⁵ M, pH 7,4.

Le ligand L¹ forme un complexe plus stable avec le Zn²⁺ qu'avec le Mn²⁺, comme prédit par la série d'Irving-Williams.¹¹ En comparaison aux complexes [Mn(PyC3A)]⁻,¹ [Mn(tCDTA)]²⁻² et [Mn(PC2A-EA)]²⁺³, Mn(L¹) a une stabilité thermodynamique plutôt modeste.

Le complexe Mn(L¹) a deux constantes de protonation détectables par pH-potentiométrie. La première est attribuée à l'amine primaire de la chaîne lysine qui ne participe pas à la complexation du manganèse. Cette constante est d'ailleurs pratiquement identique à celle déterminée pour la protonation de l'amine de la lysine dans le ligand seul. La seconde constante de protonation peut être attribuée au carboxylate qui avait la constante de protonation la plus élevée (logK_{H3} = 4,71) au sein du ligand.

La figure 2.15 ci-dessous illustre les équilibres et espèces mises en jeu.

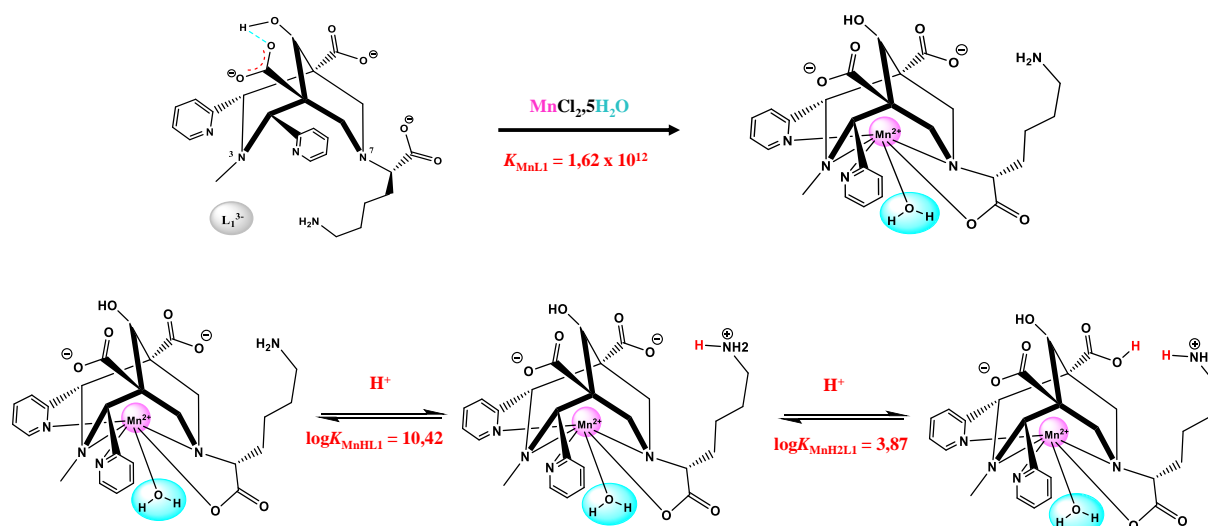


Figure 2.15 : Schéma illustratif des équilibres et espèces mises en jeu.

La figure 2.16 représente la distribution des espèces pour le système Mn/L¹ calculée à partir des constantes déterminées, ainsi que l'évolution de la relaxivité en fonction du pH.

Le profil de la relaxivité en fonction du pH valide parfaitement les courbes de distribution, et donc les constantes déterminées par potentiométrie. Le plateau observé dans l'évolution de la relaxivité à partir de pH 6 coïncide avec la formation totale de l'espèce [Mn(HL¹)]. Alors, on peut en déduire qu'à pH physiologique, le complexe [Mn(HL¹)] est mono-protoné.

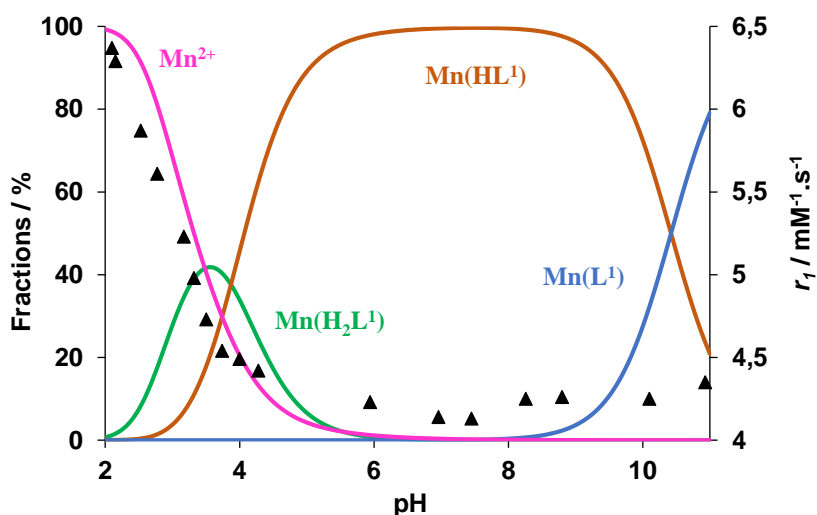


Figure 2.16 : Courbes de distribution des espèces chimiques et de l'évolution de la relaxivité en fonction du pH. $c_{\text{L}^1} = c_{\text{Mn}^{2+}} = 1 \text{ mM}$.

Caractérisation du complexe $[\text{Mn}(\text{L}^1)]$ hautement inerte

Pour comparer la stabilité des complexes formés par des ligands de basicité différente, on utilise souvent la valeur de pM (M : métal correspondant), qui évalue la quantité de métal libre à pH 7,4 et typiquement à une concentration de métal et de ligand de 10^{-5} M : $\text{pM} = -\log[\text{M}_{\text{libre}}]$

La valeur de pMn obtenue pour $\text{Mn}(\text{L}^1)$ est plus faible que celle des autres complexes de référence.

Pour une non-toxicité *in vivo*, cette stabilité relativement faible devrait être compensée par une inertie élevée. En effet, l'idéal est de concevoir un agent de contraste qui ne se dissocie pas une fois injecté dans l'organisme.

De ce constat, réaliser une étude de cinétique de dissociation, afin d'évaluer l'inertie cinétique du complexe est indispensable.

3. Inertie du complexe $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$

L'inertie d'un complexe évalue la capacité du ligand à empêcher la dissociation, donc le relargage du métal. Elle dépend principalement des paramètres intrinsèques du complexe et de la composition du milieu considéré (par exemple, de la concentration en H^+ , de la présence de cations métalliques, d'anions).

Dans ce contexte, des réactions de transmétallation ont été mises en jeu en présence de Zn^{2+} entre pH 3,1 et 6,0. En outre, une étude à pH très acide a aussi été faite (0,01 – 1 M).

3.1. Etude de l'inertie de $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ entre pH 3,1 et 6,0 en présence de zinc (Zn^{2+})

Le choix du Zn^{2+} comme cation de transmétallation dans les études de cinétique de dissociation est dû au fait qu'il est l'un des métaux endogènes les plus abondants qu'on retrouve dans le sang à une concentration mobilisable de $\sim 10^{-5}$ M (lié ou pas à l'albumine) ; et qu'il forme des complexes plus stables que ceux à base de Mn^{2+} . Alors, il peut provoquer une réaction de transmétallation, et en conséquence promouvoir le relargage du Mn^{2+} dans l'organisme.

Pour évaluer l'inertie du complexe $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$, nous avons travaillé dans des conditions de pseudo-premier ordre, en mettant en jeu 50 équivalents de Zn^{2+} par rapport au complexe à

différents pH (3,13 à 6,00, dans des solutions tamponnées), à 37 °C. Pour suivre la dissociation, nous avons mesuré le temps de relaxation longitudinale en fonction du temps (figure 2.17). En effet, l'augmentation de la vitesse de relaxation longitudinale paramagnétique ($R_{1p} = 1/T_{1p}$) reflète la libération du Mn^{2+} du complexe. A la fin de la réaction, on obtient la vitesse de relaxation longitudinale paramagnétique du manganèse libre $[Mn(H_2O)]^{2+}$ ($\sim 14 \text{ s}^{-1}$), synonyme de dissociation totale.

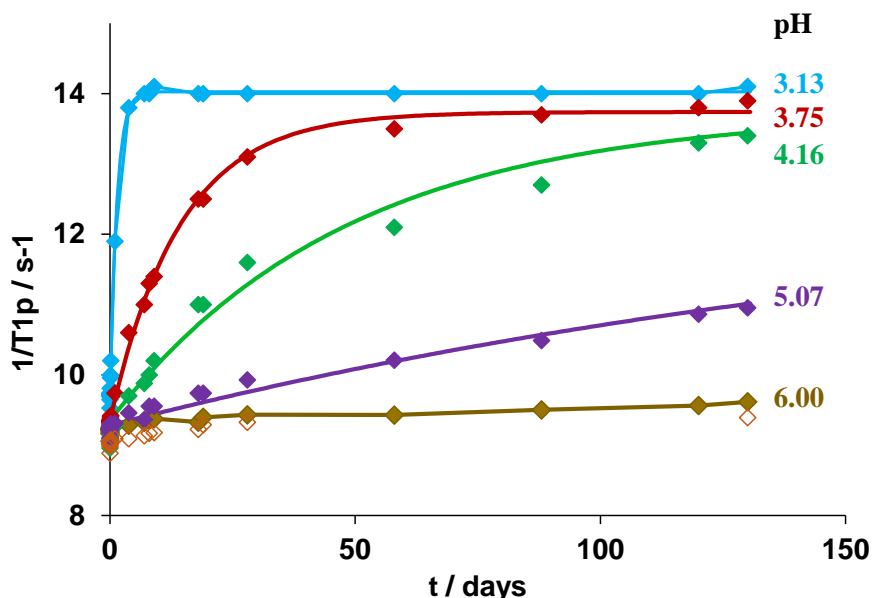


Figure 2.17 : Variation de la vitesse de relaxation longitudinale paramagnétique de $Mn(HL^1)$ en présence de 50 equ de Zn^{2+} , en fonction du temps, à 37 °C, à différents pH, 60 MHz. Les courbes représentent les ajustements. \diamond : en présence de 10 equ de Zn^{2+} . $I = 0,1 \text{ M}$ de KCl.

Entre pH 3,13 et 5,07, on observe la dissociation du complexe, avec une décomplexation totale dans les échantillons à pH 3,13, 3,75 et 4,16 pendant la durée de l'expérience, 144 jours. En revanche, à pH 6, aucune dissociation n'est détectable (résultat identique à 10 et 50 équivalents de Zn^{2+}). L'ajustement des vitesses de relaxation expérimentales a permis de calculer les constantes de vitesse, k_{obs} , entre pH 3,13 et 5,07 et d'estimer les temps de demi-vie, $t_{1/2}$ (tableau 2.3).

Caractérisation du complexe $[\text{Mn}(\text{L}^1)]$ hautement inerte

Tableau 2.3 : Constantes de vitesse de dissociation observées (k_{obs}) et temps de demi-vie du complexe aux différents pH.

pH	c_{H^+} (M)	k_{obs} (s^{-1})	$t_{1/2}$
3,13	$7,41 \times 10^{-4}$	$8,47 \times 10^{-6}$	22,7 h
3,75	$1,78 \times 10^{-4}$	$8,17 \times 10^{-7}$	10 j
4,16	$6,92 \times 10^{-5}$	$2,40 \times 10^{-7}$	33 j
5,07	$8,51 \times 10^{-6}$	$5,87 \times 10^{-8}$	137 j

Ces résultats mettent en évidence une inertie inédite du complexe $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$. L'intégrité du complexe à pH 6 et en présence de 50 équivalents de Zn^{2+} est exceptionnelle. Dans ces mêmes conditions (pH 6, 50 equ de Zn^{2+} , 37 °C), les complexes $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$ et $[\text{Mn}(\text{tCDTA})]^{2-}$ se dissocient en moins d'une heure (figure 2.18), et les complexes $[\text{Mn}(\text{PyC3A})]^-$ et $[\text{Mn}(\text{PC2A-EA})]^+$, considérés comme référence dans la littérature, se dissocient respectivement avec un temps de demi-vie de 0,29¹ et 54,4 h.³ En dépit de sa stabilité modeste, $\text{Mn}(\text{HL}^1)$ devient le complexe de Mn^{2+} monohydraté le plus inerte connu à ce jour. Cette très haute inertie cinétique à pH 6 est la conséquence du fait que la cavité bicyclique protège parfaitement le Mn^{2+} , lui servant de bouclier à une éventuelle attaque du Zn^{2+} et du H^+ .

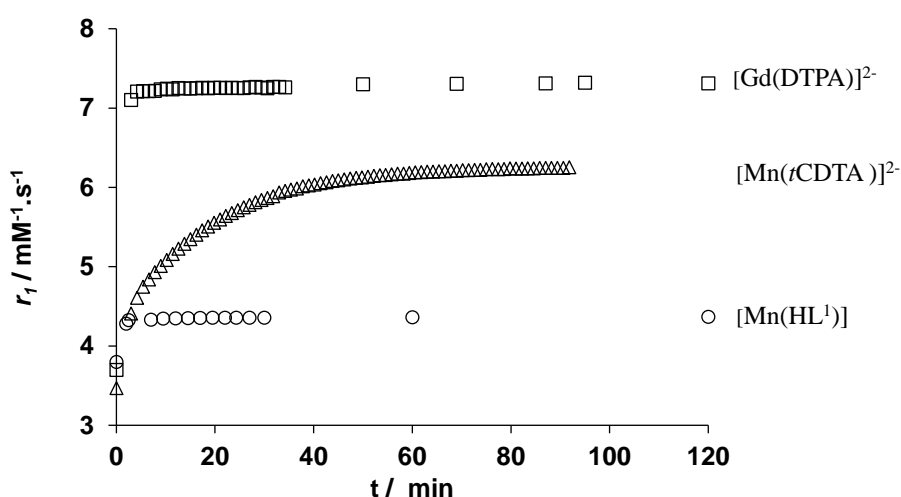


Figure 2.18 : Comparaison de la cinétique de dissociation des complexes $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$ (□), $[\text{Mn}(\text{tCDTA})]^{2-}$ (Δ) et $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ (○), à pH 6, 50 equ Zn^{2+} , 37 °C, 60 MHz.

En inspectant de plus près l'évolution de la vitesse de relaxation dans la solution du $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ à pH 6 en présence du Zn^{2+} (figure 2.17), on note une légère augmentation instantanée d'environ 21% de la vitesse de relaxation longitudinale au début de l'expérience, sans aucun changement ultérieur. Cette variation est parfaitement reproductible. De façon similaire, une légère augmentation de relaxivité est observée en absence de Zn^{2+} , quand on change le pH d'une solution de $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ de 7 à 5. Ces observations suggèrent la formation d'une autre espèce stable sans impliquer la dissociation du complexe. Suite à ces résultats, des études RMN à ces deux pH ont été réalisées, afin de mieux comprendre ce phénomène (voir la partie 5 de ce chapitre).

3.2. Etude de l'inertie de $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ à pH très acide en absence de Zn^{2+}

La dissociation du complexe $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ a aussi été évaluée dans des solutions très acides ($c_{\text{H}} = 0,01 - 1 \text{ M}$) où la réaction est plus rapide et donc plus facile à observer, à $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

La figure 2.19 représente l'évolution de la constante de dissociation, k_{obs} , en fonction de la concentration de H^+ . On note une dépendance de second ordre en concentration de protons, donc les données expérimentales ont été analysées en utilisant l'équation 2.4 ci-dessous.

$$k_{\text{obs}} = k_0 + k_1 [\text{H}^+] + k_2 [\text{H}^+]^2 \quad \text{équation 2.4}$$

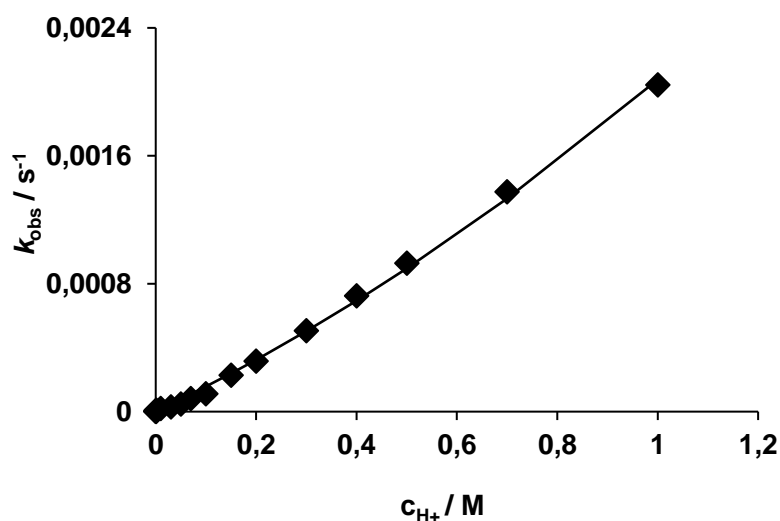


Figure 2.19 : Variation de la constante de vitesse k_{obs} de $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ en fonction de la concentration en H^+ . La courbe représente l'ajustement.

Caractérisation du complexe $[\text{Mn}(\text{L}^1)]$ hautement inerte

Dans cette équation, k_0 représente la constante de vitesse de la dissociation spontanée, k_1 et k_2 sont les constantes de vitesse correspondantes à la dissociation proton-catalysée, respectivement du $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ et de sa forme protonée. Le fit a donné des valeurs respectives de k_1 et k_2 égales à $(1,6 \pm 0,1) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ et $(5,0 \pm 0,1) \times 10^{-4} \text{ M}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; avec k_0 a été fixé à zéro, autrement le fit a conduit à une valeur négative, avec une erreur trop importante $(-3,5 \pm 2) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. Ceci n'est pas étonnant car cette expérience est réalisée très loin du pH neutre où la dissociation spontanée pourrait être mieux observée. Même à des concentrations élevées en H^+ , on note une inertie de $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ très bonne pour un complexe de Mn^{2+} hydraté, avec des temps de demi-vie allant de 0,1 h ($c_{\text{H}} = 1 \text{ M}$) à 10 h ($c_{\text{H}} = 0,01 \text{ M}$).

Par ailleurs, les valeurs de k_{obs} calculées dans l'expérience plus haut, en présence des 50 équivalents de Zn^{2+} (figure 2.17 et tableau 2.3), montrent le même type de dépendance de second ordre de c_{H} (figure 2.20), dont le fit avec l'équation 2.4 donne un résultat similaire pour la constante de vitesse caractérisant la dissociation proton-assistée du complexe, $k_1 = (2,2 \pm 0,2) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$. Les autres constantes sont obtenues avec une trop grande erreur $k_0 = (2,8 \pm 2) \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ et $k_2 = (12 \pm 2) \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-2}$, en raison du nombre de points très limité et la gamme de pH trop élevée pour déterminer la constante de vitesse pour la dissociation proton-assistée du complexe monoprotoné (k_2).

Le k_1 est inférieur de deux ordres de grandeur à celui du complexe $[\text{Mn}(\text{PC2A-EA})]^+$ ($6,0 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$)³, considérée précédemment comme le complexe de Mn^{2+} hydraté le plus inerte.

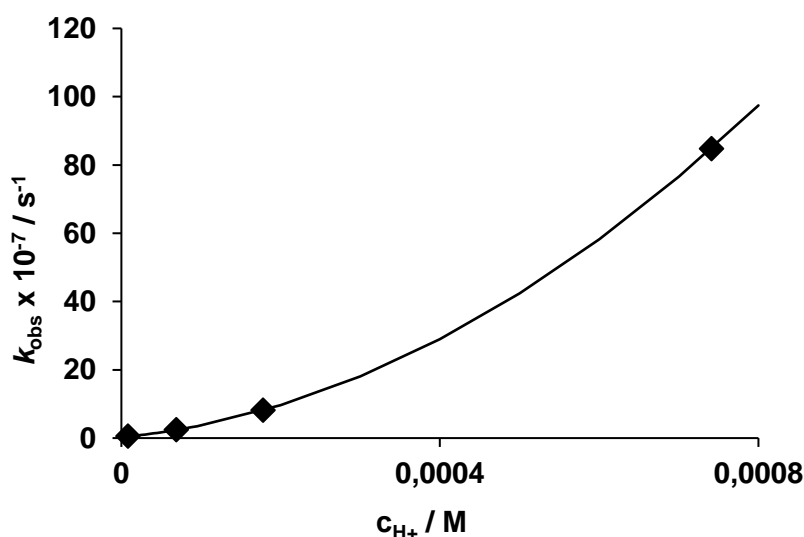


Figure 2.20 : Variation de la constante de vitesse (k_{obs}) de $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ en fonction de la concentration en protons en présence de 50 équivalents de Zn^{2+} . La courbe représente l'ajustement.

4. Propriétés de relaxation du complexe [Mn(HL¹)]

L'étude des propriétés de relaxation d'un complexe paramagnétique est essentielle dans l'évaluation de son efficacité en tant qu'agent de contraste IRM potentiel. Ainsi, pour caractériser la relaxivité du complexe [Mn(HL¹)] et des paramètres qui la gouvernent, nous avons réalisé une étude RMN de l'¹⁷O à température variable, à 9,4 T, et enregistré des profils NMRD en fonction du champ magnétique à 25 °C et 37 °C.

L'étude RMN de l'¹⁷O nous a permis dans un premier temps de déterminer le nombre de molécules d'eau (q) au sein de la première sphère de coordination. Le Dr. Peter Caravan et ses collaborateurs ont démontré que le maximum de la courbe de la relaxivité transversale r_2° de l'¹⁷O en fonction de la température est proportionnel au nombre de molécules d'eau coordonnées au Mn²⁺ (q), selon l'équation 2.5.¹²

$$q = r_2^{\circ}_{\max} / 510 \quad \text{équation 2.5}$$

Cette proportionnalité entre q et $r_2^{\circ}_{\max}$ est valable à suffisamment hauts champs magnétiques où les r_2° sont essentiellement gouvernées par l'échange d'eau et la contribution de la relaxation électronique est négligeable. De plus, la valeur de la constante de couplage scalaire de l'¹⁷O peut être considérée invariable pour différents complexes de Mn²⁺.

La figure 2.21 représente l'évolution de la relaxivité transversale mesurée dans une solution aqueuse de [Mn(HL¹)] en fonction de la température.

Caractérisation du complexe $[\text{Mn}(\text{L}^1)]$ hautement inerte

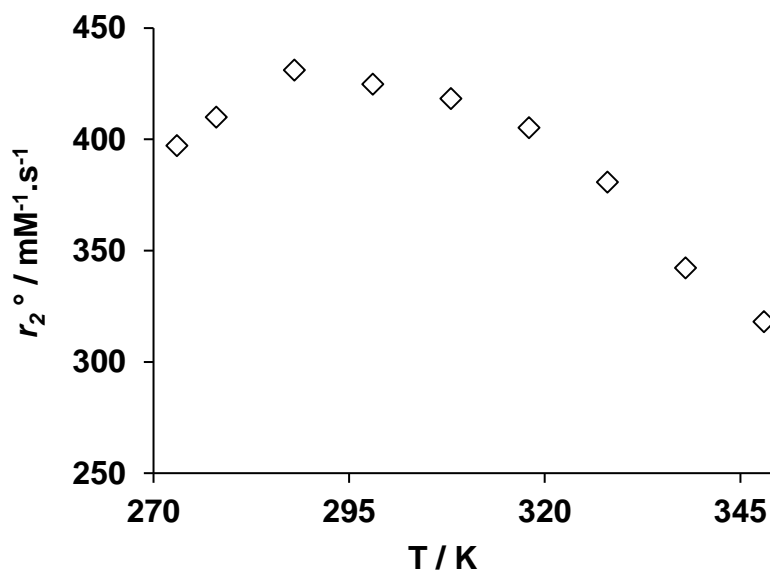


Figure 2.21 : Variation de la relaxivité transversale de $l'^{17}\text{O}$ en fonction de la température dans une solution $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$, pH 7,36 ; $c_{[\text{Mn}(\text{HL}^1)]} = 3,56 \text{ mM}$. 400 MHz.

Le maximum est obtenu vers 288 K, et en introduisant la valeur de $r_{2^\circ \text{max}}$ dans l'équation 2.5, on obtient $q = 0,85$ qui reflète la présence d'une molécule d'eau au sein de la première sphère de coordination du Mn^{2+} . Les cinq groupements donneurs du ligand sont donc complétés par une molécule d'eau pour complexer le métal, conduisant à un nombre de coordination de 6 au total.

Les mesures de temps de relaxation transversale de $l'^{17}\text{O}$ permettent également de déterminer la vitesse d'échange d'eau du complexe. Les mêmes données expérimentales que celles sur la figure 2.21, mais dans la représentation plus habituelle, (figure 2.22) montrent l'évolution de la vitesse de relaxation transversale réduite de $l'^{17}\text{O}$ en fonction de l'inverse de la température. Nous observons deux régimes distincts : à basses températures ($< 295 \text{ K}$), les valeurs de $1/T_{2r}$ augmentent avec la température, correspondant au régime d'échange d'eau lent. Ici c'est la vitesse d'échange d'eau, k_{ex} , qui détermine $1/T_{2r}$. En revanche, à plus haute température, $1/T_{2r}$ diminue quand la température augmente, correspondant à un régime d'échange d'eau rapide. Dans cette zone, $1/T_{2r}$ est déterminé par le k_{ex} , mais également par la relaxation électronique du Mn^{2+} , ainsi que la constante de couplage scalaire, A/\hbar . L'analyse des ces données est faite simultanément avec les valeurs de relaxivité.

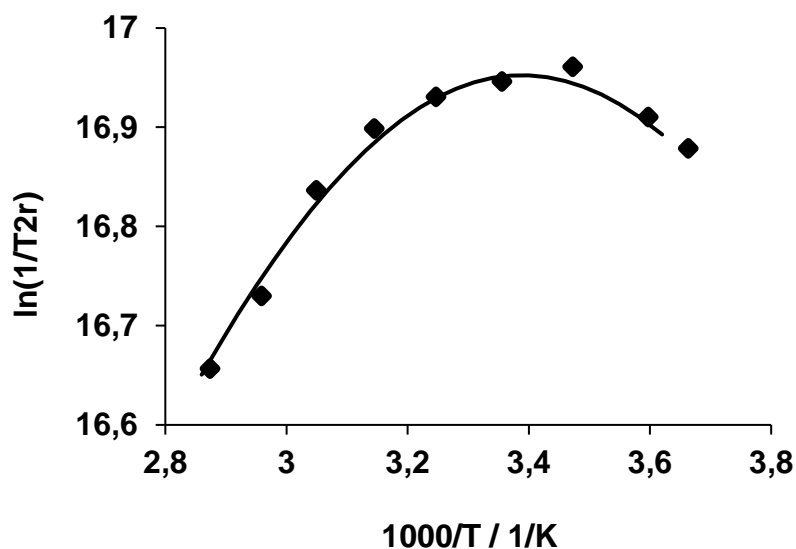


Figure 2.22 : Variation de la vitesse de relaxation transversale réduite de l'oxygène 17 de $[Mn(HL^1)]$ en fonction de la température. pH 7,36 ; $c_{[MnHL^1]} = 3.56$ mM. 400 MHz. La courbe représente l'ajustement.

Les mesures de temps de relaxation longitudinal de 1H (profils NMRD) ont été réalisées en fonction du champ magnétique, à 25 et 37°C, en milieu aqueux et aussi en présence de HSA (Human Serum Albumin) (figure 2.23).

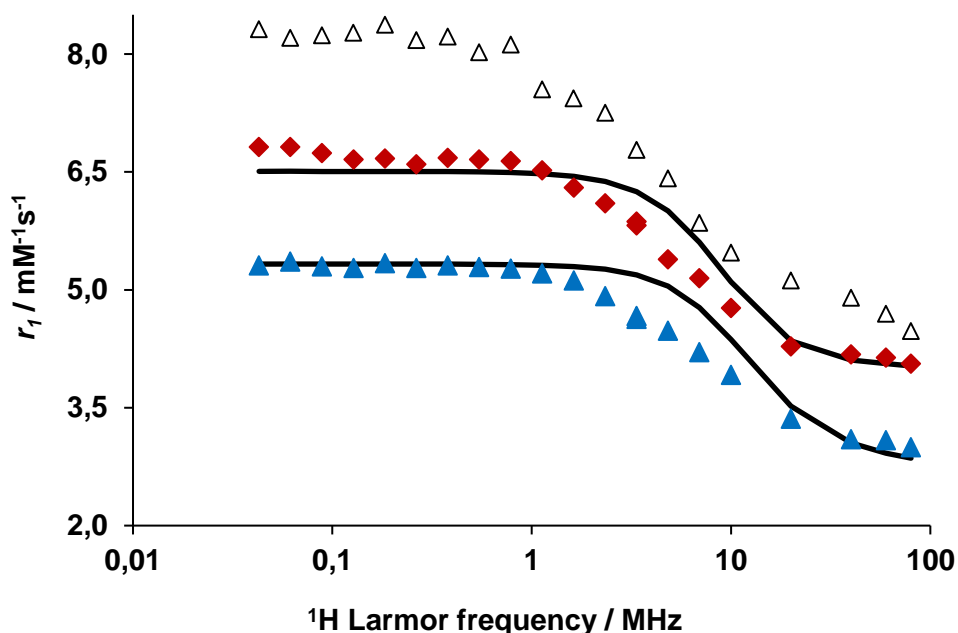


Figure 2.23 : Profils NMRD du complexe $[Mn(HL_1)]$ en milieu aqueux et en présence de HSA ; Δ : en présence HSA à 37 °C ; \blacktriangle : milieu aqueux à 37 °C ; \blacklozenge : milieu aqueux à 25 °C. Les courbes représentent les ajustements.

Caractérisation du complexe $[\text{Mn}(\text{L}^1)]$ hautement inerte

Comparé aux complexes de Mn^{2+} considérés comme référence, $[\text{Mn}(\text{PyC3A})]^-$, $[\text{Mn}(\text{PC2A-EA})]^+$ et $[\text{Mn}(\text{CDTA})]^{2-}$, avec respectivement des relaxivités de $3,30^1$, $3,52^3$ et $3,79 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, à 25°C , 20 MHz, le complexe $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ a une meilleure relaxivité ($4,28$ et $3,36 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, respectivement à 25 et 37°C , 20 MHz). Cette valeur est similaire à celle des agents de contraste à base de Gd^{3+} commercialisés, tel que le DOTAREM ($3,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; 37°C ; 20 MHz¹³), ce qui est assez remarquable étant donné le spin électronique plus bas du Mn^{2+} par rapport au Gd^{3+} . Comme attendu, la forme des courbes NMRD correspond à un complexe de petite taille. En présence de HSA, on note une augmentation modeste de la relaxivité, qui reflète une liaison faible et non-spécifique avec l'albumine. Le même phénomène a souvent été observé pour d'autres complexes, comme par exemple pour le $[\text{Mn}(\text{PyC3A})]^-$.

La relaxivité reste constante en présence de 5, 10, 20, 30, 40, 50 équivalents de phosphates, carbonates, ou citrates et pendant au moins une semaine (figure 2.24).



Figure 2.24 : Evolution de la relaxivité du complexe $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ en présence d'anions endogènes, pendant une semaine, à 25°C , 60 MHz. \diamond : carbonate ; \triangle : phosphate ; \square : citrate. $c_{[\text{Mn}(\text{HL}^1)]} = 1 \text{ mM}$. $I = 0,1 \text{ M}$.

Afin de calculer les paramètres microscopiques qui déterminent la relaxivité, les valeurs de $1/T_{2r}$ de $l^{17}\text{O}$ et les relaxivités ont été analysées ensemble selon la théorie de Solomon-Bloembergen-Morgan. Dans le fit, certains paramètres ont été fixés à des valeurs habituelles : la distance entre le cation métallique et le proton de la molécule d'eau en première sphère et dans la sphère externe, respectivement à $r_{\text{MnH}} = 2,83 \text{ \AA}$ et $a_{\text{MnH}} = 3,6 \text{ \AA}$ ¹⁴, le coefficient de

diffusion et son énergie d'activation à $D_{\text{MnH}} = 26 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et $E_{\text{MnH}} = 20 \text{ kJ mol}^{-1}$, et l'énergie d'activation pour la relaxation électronique à $E_v = 1 \text{ kJ mol}^{-1}$. Les paramètres suivants ont été calculés : la vitesse d'échange d'eau, k_{ex}^{298} , l'enthalpie et l'entropie d'activation de l'échange, ΔH^\ddagger et ΔS^\ddagger , le temps de corrélation rotationnel, τ_{RH}^{298} , et son énergie d'activation E_R , les paramètres caractéristiques de la relaxation électronique, comme l'énergie de l'éclatement du champ, Δ^2 et le temps de corrélation pour la modulation du zero field splitting, τ_v^{298} , ainsi que la constante de couplage scalaire de l' ^{17}O , A/\hbar . Le nombre d'hydratation a été fixé à $q = 1$. Les paramètres obtenus dans le fit sont représentés dans le tableau 2.5.

Cependant, le temps de corrélation rotationnel ($\tau_{\text{RH}} = 100 \text{ ps}$) semble être trop élevé pour un complexe de Mn^{2+} de cette taille (par exemple, des τ_{RH} de 56 et de 46 ps ont été respectivement reportés pour les complexes $[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$ et $[\text{Mn}(1,4\text{-DO2A})]$). Une telle surestimation du τ_{RH} lors de cet ajustement peut être la conséquence du fait que des molécules d'eau présentes dans la seconde sphère de coordination contribuent également à la relaxivité, mais n'ont pas été considérées dans ces calculs. En effet, le complexe $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ possède deux carboxylates portés par C1 et C5, non engagés dans la coordination du Mn^{2+} qui peuvent établir des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau environnantes, avec comme conséquence une contribution de la seconde sphère de coordination au mécanisme de relaxation.

L'analyse des données NMRD a été alors refaite en intégrant la contribution de la seconde sphère à la relaxivité. Ainsi, pour ces calculs, nous avons considéré que chaque carboxylate se lie avec une molécule d'eau, avec une distance Mn-H(proton H_2O) estimée à 3,2 Å, un temps de résidence de la molécule d'eau dans la deuxième sphère estimé à 50 ps et son enthalpie d'activation à 10 $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, selon des simulations réalisées précédemment.¹⁵

L'ensemble des équations utilisées sont décrites dans l'annexe.

Le tableau 2.5 représente les résultats obtenus dans les deux cas (avec et sans considération de la seconde sphère), et la figure 2.25 illustre la contribution de la seconde sphère à la relaxivité.

Caractérisation du complexe [Mn(L¹)] hautement inerte

Tableau 2.5: Les paramètres de relaxation du complexe [Mn(HL¹)] avec et sans considération de la contribution de la seconde sphère de coordination.

	[Mn(HL ¹): sans considération de la 2 nd sphère à la relaxivité	[Mn(HL ¹): avec considération de la 2 nd sphère à la relaxivité
k_{ex}^{298} (10^7 s ⁻¹)	5,1 ± 0,7	5,3 ± 0,5
ΔH^\ddagger (kJ.mol ⁻¹)	10,6 ± 1,1	10,9 ± 1,0
ΔS^\ddagger (kJ.mol ⁻¹)	-62 ± 8	-60 ± 8
E_{rH} (kJ.mol ⁻¹)	22 ± 1	28 ± 3
τ_{rH}^{298} (ps)	100 ± 5	72 ± 4
τ_v^{298} (ps)	24 ± 10	16 ± 8
Δ^2 (10^{-19} s ⁻²)	0,8 ± 0,1	1,96 ± 0,08
A_0/\hbar (10^6 rad.s ⁻²)	28,0 ± 0,1	30,0 ± 0,1

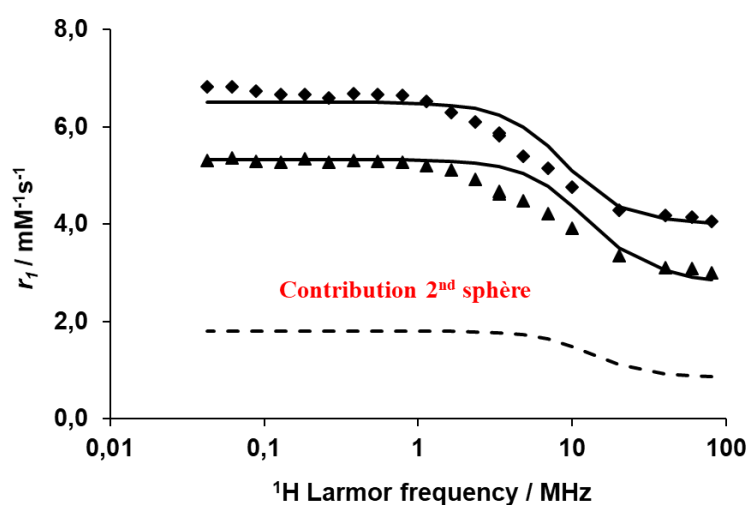


Figure 2.25 : Profils NMRD du complexe [Mn(HL¹)] en milieu aqueux à 25, 37 °C ; et illustration de la contribution de la seconde sphère. Les courbes représentent les ajustements.

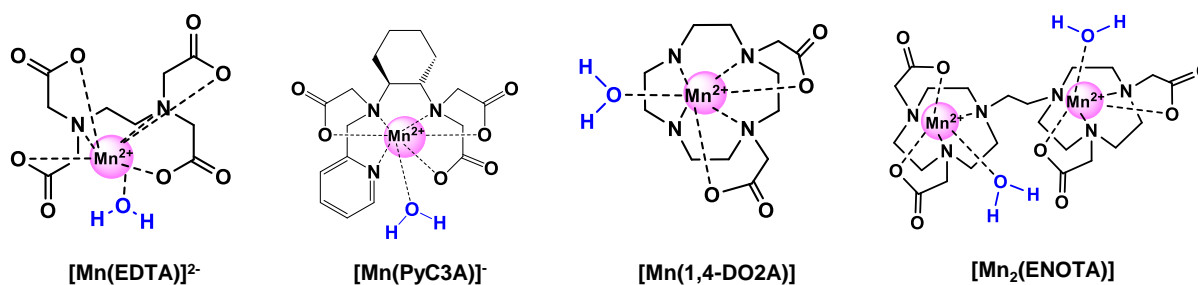
Avec la considération de la seconde sphère, le temps de corrélation rotationnelle est de 72 ps, une valeur plus raisonnable par rapport à la taille du complexe [Mn(HL¹)]. La contribution de la deuxième sphère à la relaxation explique aussi la très bonne relaxivité. Dans un but d'étayer ce résultat, dans le chapitre 3, une étude comparative est faite entre le complexe [Mn(HL¹)] et

un de ces dérivés, qui diffère de lui par la présence de groupements alcool primaire à la place des carboxylates portés par C1 et C4.

En ce qui concerne l'échange de la molécule d'eau, la constante de vitesse calculée ($k_{\text{ex}}^{298} = (5,1 \pm 0,7) \times 10^7 \text{ s}^{-1}$) est similaire à celle du $[\text{Mn}(\text{PyC3A})]^-$ ($k_{\text{ex}}^{298} = 5,4 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$). Dans la famille des complexes de Mn^{2+} , cet échange d'eau reste relativement lent (voir tableau 1.2 dans l'introduction), par exemple en comparaison à celui du complexe $[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$, $k_{\text{ex}}^{298} = 44 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ ¹². Néanmoins, l'échange est d'un ordre de grandeur plus rapide que celui des complexes de Gd^{3+} typiquement utilisés en IRM. Toutefois, la constante de vitesse est suffisamment élevée pour ne pas limiter la relaxivité. Sur la base de la valeur fortement négative de l'entropie d'activation de l'échange ($\Delta S^\ddagger = -62 \text{ kJ.mol}^{-1}$), et même en tenant compte de la large erreur qui est typiquement associée à la détermination de l'entropie, on peut conclure que le mécanisme de la réaction est associatif. Ceci est attendu pour un complexe de Mn^{2+} hexacoordiné, en sachant que le nombre de coordination typique des complexes de Mn^{2+} est soit 6 soit 7.

Tableau 2.6 : Comparaison des paramètres d'échange d'eau et du temps de corrélation rotationnel des complexes de Mn^{2+} .

	q	$k_{\text{ex}}^{298} / 10^7 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$\Delta H^\ddagger \text{ (kJ.mol}^{-1}\text{)}$	$\Delta S^\ddagger \text{ (kJ.mol}^{-1}\text{)}$	$\tau_{\text{rH}}^{298} \text{ (ps)}$
$[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$	1	$5,1 \pm 0,7$	$10,6 \pm 1,1$	-62 ± 8	72 ± 4
$[\text{Mn}(\text{PyC3A})]^-$ ¹	1	5,4	37,2	-	-
$[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$ ¹⁶	1	44	32	-	57
$[\text{Mn}_2(\text{ENOTA})]$ ¹⁷	1	55	20,5	-28	85
$[\text{Mn}(1,4\text{-DO2A})]$ ¹⁴	1	1134	29,4	-	46



5. Etude RMN du complexe $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$

Les études menées précédemment pour évaluer la dissociation du complexe $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ (voir 3.1) ont révélé une inertie exceptionnelle pour un complexe de Mn^{2+} monohydraté. Lors de ces études, nous avons également noté un phénomène inattendu. Quand une solution de $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$, préparée à pH 7, est mélangée avec du Zn^{2+} tamponnée avec du MES (pH 6), on observe immédiatement une légère augmentation de la relaxivité (29 %, pour 50 equ Zn^{2+} , 37 ou 25 °C). Curieusement, une augmentation similaire est également détectée en absence de Zn^{2+} ; quand on change le pH de la solution de $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ de 7 à 5 (dans un tampon, 25 °C), r_1 augmente de 12 %. Tous ces changements sont parfaitement reproductibles, alors que par la suite, la relaxivité reste constante dans ces échantillons pendant plusieurs semaines, comme illustrée par la figure 2.26-a. Il est à noter que pour pouvoir observer ces variations de relaxivité, le complexe $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ doit avoir été préparé à pH 7. En le préparant à pH 6, sa relaxivité sera similaire à celle d'un échantillon de pH 7, comme cela a été présenté sur la figure 2.16.

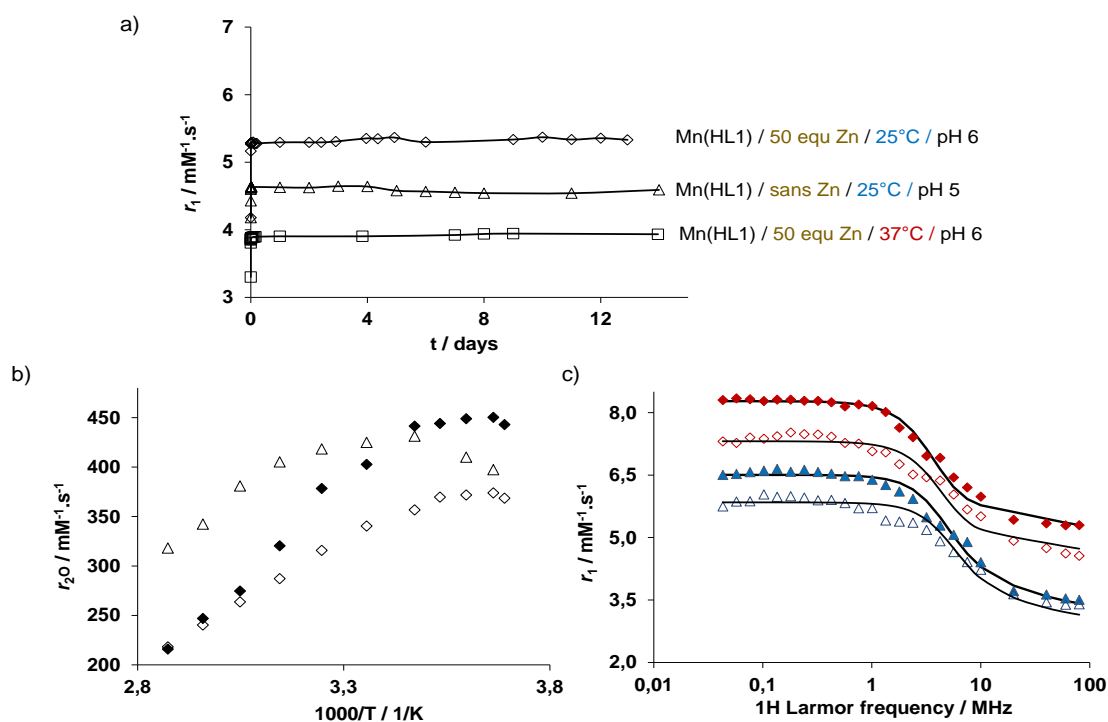


Figure 2.26 : a) Evolution de la relaxivité en fonction du temps des différents échantillons; b) Variation de la vitesse de relaxation transversale de $l^{17}\text{O}$ du complexe $\text{Mn}(\text{HL}^1)$ en fonction de la température (Δ : pH 7,3 ; \blacklozenge : en présence de $\text{Zn}^{2+} / \text{pH } 6$; \diamond : en absence de $\text{Zn}^{2+} / \text{pH } 5$); c) Profils NMRD (\blacklozenge : en présence de $\text{Zn}^{2+} / \text{pH } 6 / 25^\circ\text{C}$; \blacktriangle : en présence de $\text{Zn}^{2+} / \text{pH } 6 / 37^\circ\text{C}$; \diamond : en absence de $\text{Zn}^{2+} / \text{pH } 5 / 25^\circ\text{C}$; \triangle : en absence de $\text{Zn}^{2+} / \text{pH } 5 / 37^\circ\text{C}$. Les courbes représentent les ajustements.

Afin d'expliquer ce phénomène intrigant, différentes expériences ont été réalisées, en se focalisant sur deux cas particuliers : i) $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ (préparé à pH 7), ramené à pH 6 en présence de 50 équ de Zn^{2+} ; et ii) $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ (préparé à pH 7), ramené à pH 5 sans Zn^{2+} .

1. Tout d'abord, la présence du Mn^{2+} libre a été exclue. Les profils NMRD enregistrés dans ces échantillons (25 et 37 °C ; figure 2.26-c) confirment l'absence de $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ car il n'y a pas de seconde dispersion à bas champ (0,1 – 0,5 MHz), typique du Mn^{2+} libre (voir figure 1.16 dans l'introduction). Le test avec l'indicateur xylénole orange (révélateur de la présence de métaux libres) est également négatif dans l'échantillon sans zinc, à pH 5.

2. Une augmentation du nombre d'hydratation a été également écartée. Les mesures de T_2 de ^{17}O réalisées à températures variables (figure 2.26-b) montrent clairement que le complexe reste monohydraté.

Par la suite, des études RMN 1 et 2 D ont été menées sur le complexe $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ à pH 7 et 5, en absence de zinc (25 °C, D_2O , 700 MHz) pour voir si la variation de la relaxivité serait la conséquence d'une modification structurale en fonction du pH. A noter que le Mn^{2+} est fortement paramagnétique ce qui rend la RMN sur ses complexes difficile (voire impossible), même à 700 MHz. Dans tous les cas, la complexation implique des modifications plus ou moins significatives des déplacements chimiques et des couplages scalaires et dipolaires.

5.1. Etude RMN à pH 7

Le complexe $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ a été préparé à pH 7 (pD 7,41), avec un mélange équimolaire des deux réactifs $\text{L}^1/\text{Mn}^{2+}$ dans de l'eau lourde (D_2O).

Les figures 2.27-2.30 représentent les spectres RMN ^1H , TOCSY et HSQC du ligand L^1 et du complexe à pH 7, ainsi que l'illustration du périmètre d'action du Mn^{2+} paramagnétique où nous observons la disparition, le déplacement ou l'élargissement des signaux des protons, plus particulièrement ceux portés par le noyau bispidol.

Caractérisation du complexe $[Mn(L^1)]$ hautement inerte

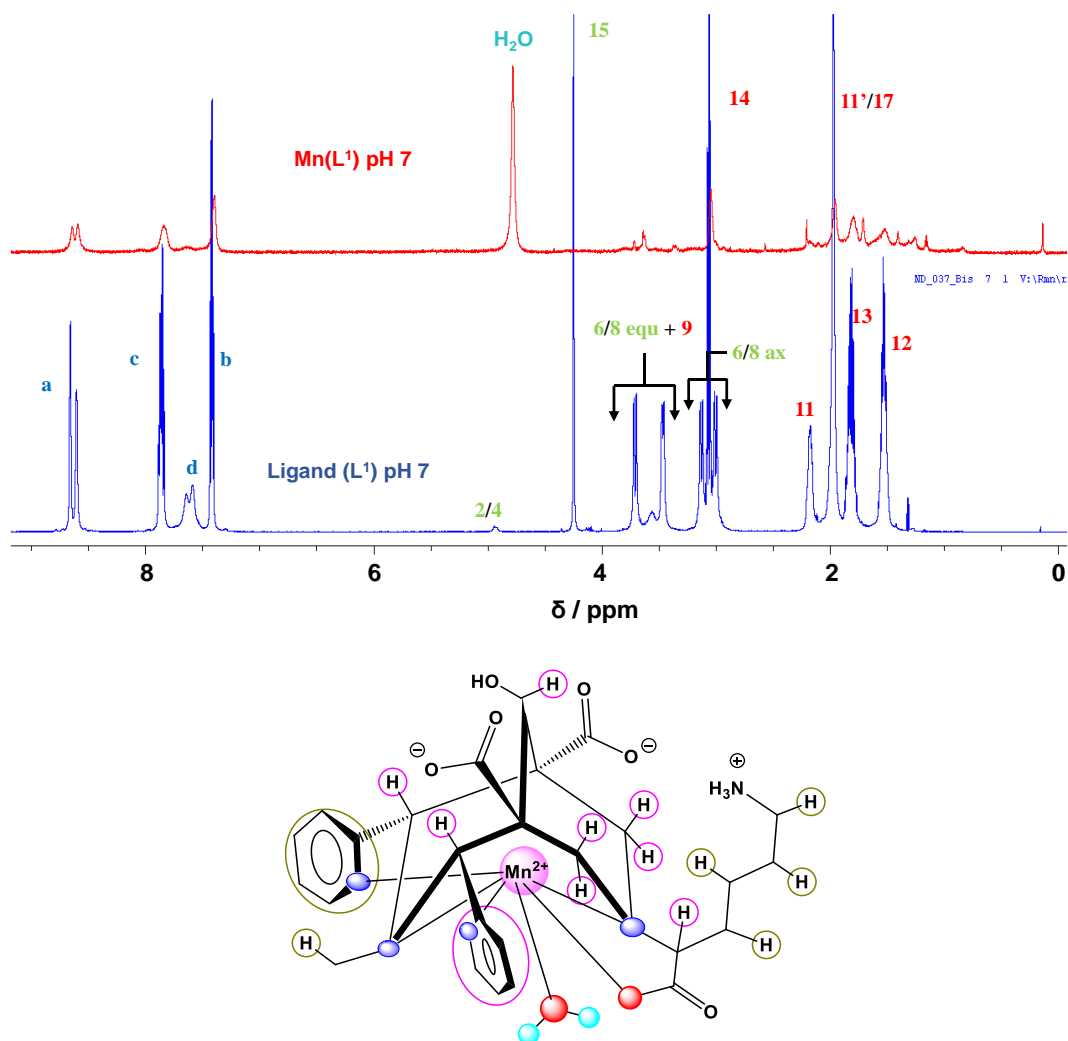


Figure 2.27 : Spectres RMN 1H du ligand (L^1) et du complexe $[Mn(HL^1)]$ dans du D_2O à pH 7 (pD 7,41), $C_{[Mn(HL^1)]} = 2,5$ mM, 700 MHz et l'illustration du champ d'action du Mn^{2+} . \circ : protons fortement affectés par l'effet paramagnétique du Mn^{2+} ; \circ : protons moins affectés, plus exploitables.

Pour les protons aromatiques du complexe, on note l'absence de tâche de corrélation pour les protons d, alors que pour les autres protons (a, b et c), on n'observe que ceux d'une des deux pyridines (figure 2.28, voir figure 2.1 pour la numérotation des atomes). Ces derniers pourraient être attribués à la pyridine 1 (py 1), qui est plus loin du Mn^{2+} que la pyridine 2 (py 2), pour laquelle nous avons suggéré une liaison hydrogène avec l'oxygène du carboxylate de la lysine dans le ligand non-complexé (voir figure 2.7).

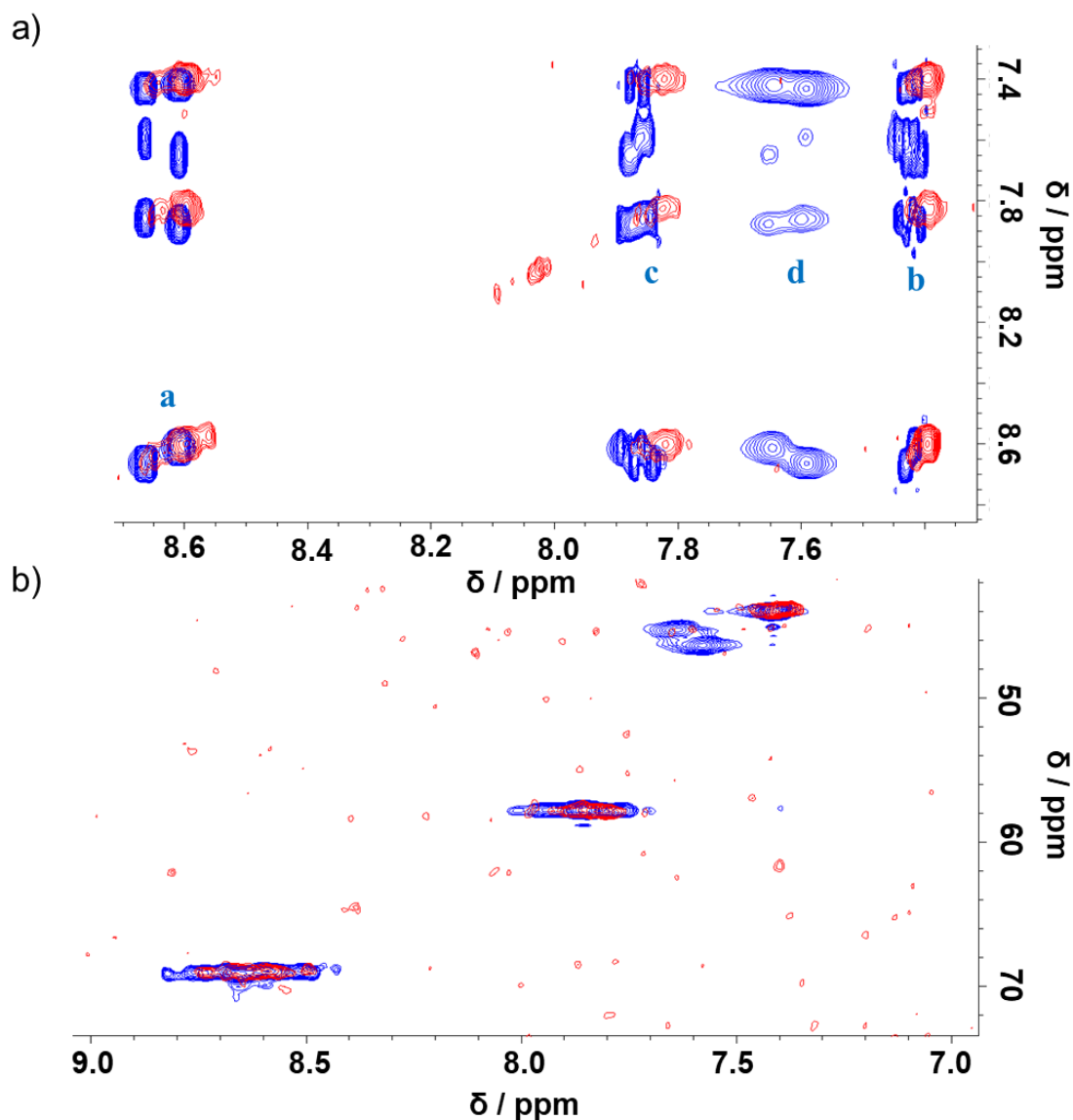


Figure 2.28 : a) Spectre TOCSY ; b) Spectre HSQC des protons aromatiques du ligand (bleu) et du $[Mn(HL^1)]$ (rouge) ; pH 7 ; 700 MHz, 25°C.

Les tâches de corrélation des protons du noyau bicyclique (2, 4, 6, 8 et 15) ou très proches (9) détectées pour le ligand non-complexé disparaissent pour le complexe (figure 2.29-a), car ces protons se trouvent tout près du Mn^{2+} . En revanche, après complexation, on observe une tâche supplémentaire pour les protons du méthyle (H17), ainsi que pour les protons méthylènes de la lysine, (H11/11', H12, H13 et H14), avec l'apparition de diastéréotopes (H12/12', H13/13' et H14/14' : figure 2.29-b). La corrélation scalaire entre ces protons diastéréotopes de la chaîne lysine est mise en évidence par le spectre TOCSY (figure 2.30).

Caractérisation du complexe $[Mn(L^1)]$ hautement inerte

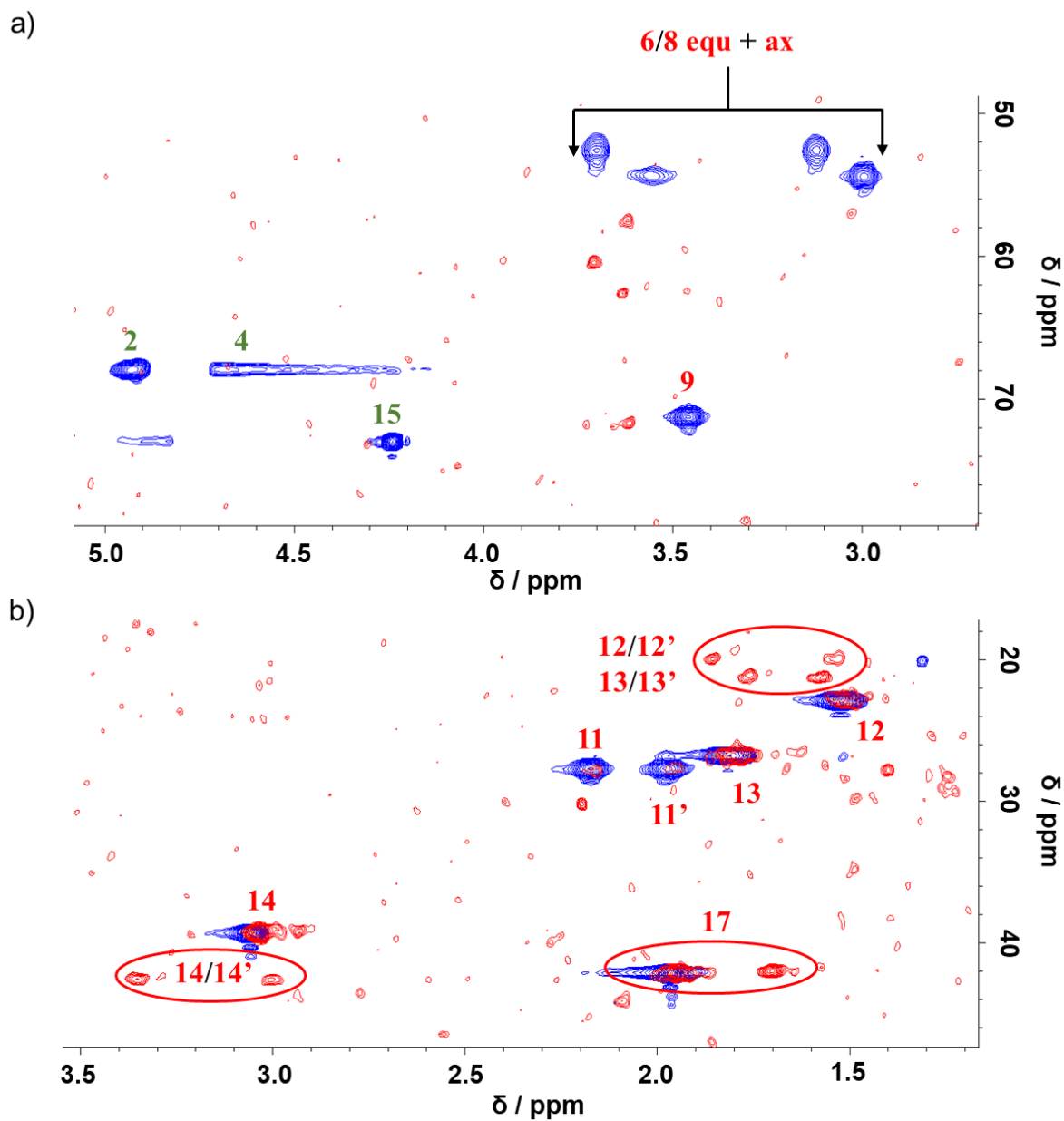


Figure 2.29 : a-b) Spectre HSQC des protons portés par le noyau bispidol et aliphatiques du ligand (bleu) et du $[Mn(HL^1)]$ (rouge) ; pH 7; 700 MHz.

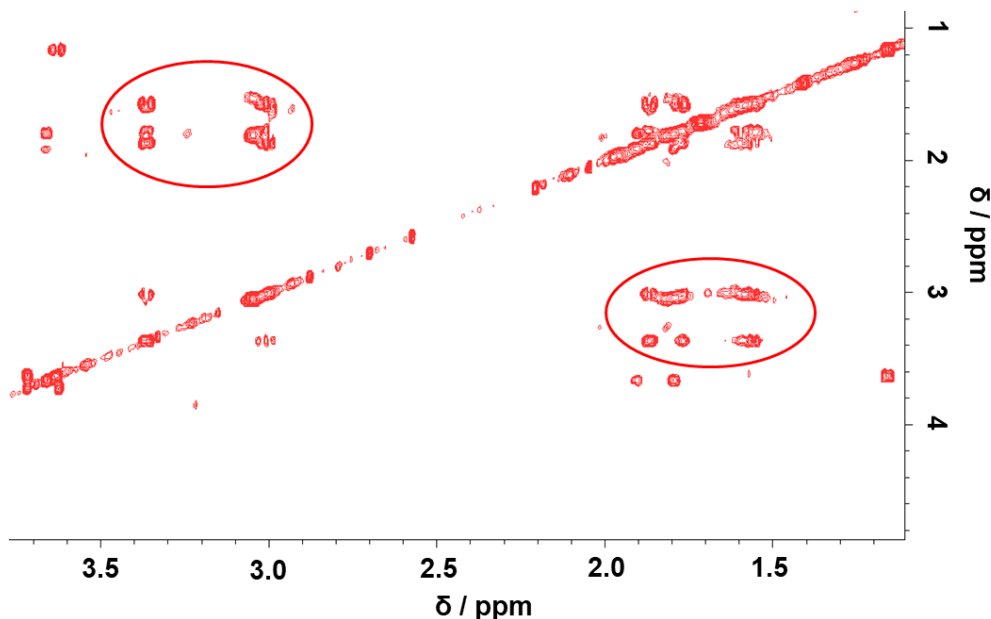


Figure 2.30 : Spectre TOCSY du complexe $[Mn(HL^1)]$ illustrant la corrélation scalaire entre les protons méthylènes de la chaîne lysine ; pH 7, 700 MHz.

L'ensemble de ces analyses nous permet de déduire l'existence de deux espèces en équilibre à pH 7, dont la chaîne lysine n'a pas la même flexibilité : dans l'une des espèces la chaîne lysine est complètement figée alors que dans l'autre, elle est en mouvement libre. La rigidification de cette chaîne pourrait être la conséquence d'une liaison hydrogène entre l'amine primaire (protonée à pH 7) et le carboxylate se trouvant dans le même plan (figure 2.31).

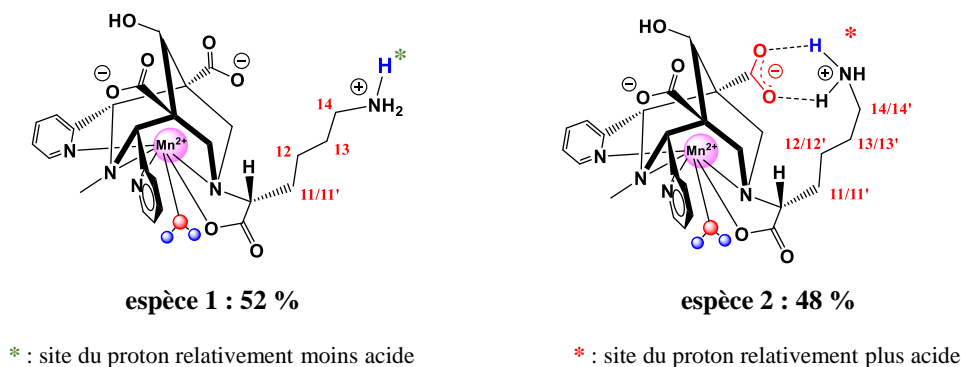


Figure 2.31 : Espèce 1 : Complexe $[Mn(HL^1)]$ avec la chaîne lysine en mouvement libre ; Espèce 2 : Complexe $[Mn(HL^1)]$ avec la chaîne lysine figée.

Pour la suite de cette étude, et comme cela était fait lors des études de cinétique de dissociation, on rajoute de l'acide pour faire passer le pH de 7 à 5, afin d'analyser la structure du complexe à pH 5.

5.2. Etude RMN à pH 5

En acidifiant la solution, nous obtenons quasiment les mêmes spectres RMN qu'à pH 7. La seule différence notable apparaît au niveau des protons méthylènes de la chaîne alkyle de la lysine et du méthyle (H17). Une seule tâche est détectée pour les protons du méthyle et une seule série de signaux pour le bras lysine (celle des protons diastéréotopes) correspondantes à l'espèce 2. Ces résultats indiquent qu'à pH 5 le complexe est quasi exclusivement sous forme de l'espèce 2 dont la chaîne lysine est figée (figure 2.32).

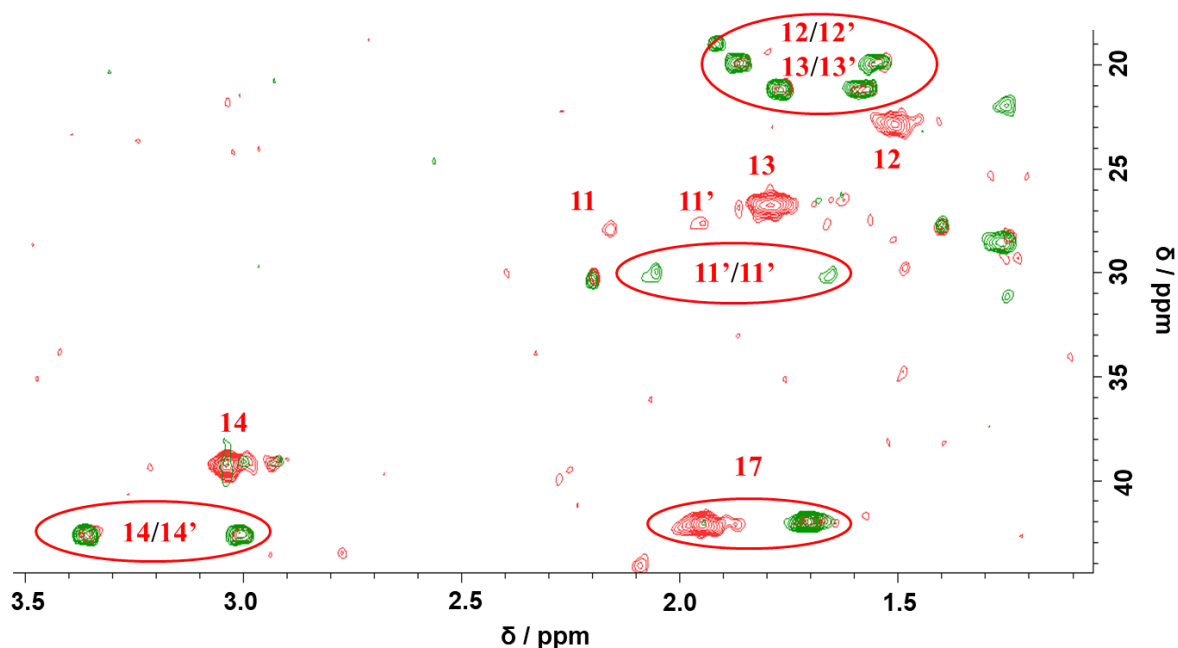


Figure 2.32 : Spectre HSQC du complexe $[Mn(L^1)]$ à pH 7 (rouge) et à pH 5 (verte), illustrant la présence quasi-exclusive de l'espèce 2 à pH 5 (pD 5,41).

Pour évaluer la proportion des deux espèces à pH 7 et 5, nous avons intégré les signaux, plus particulièrement celui des protons du méthyle (H17 ; figure 2.33).

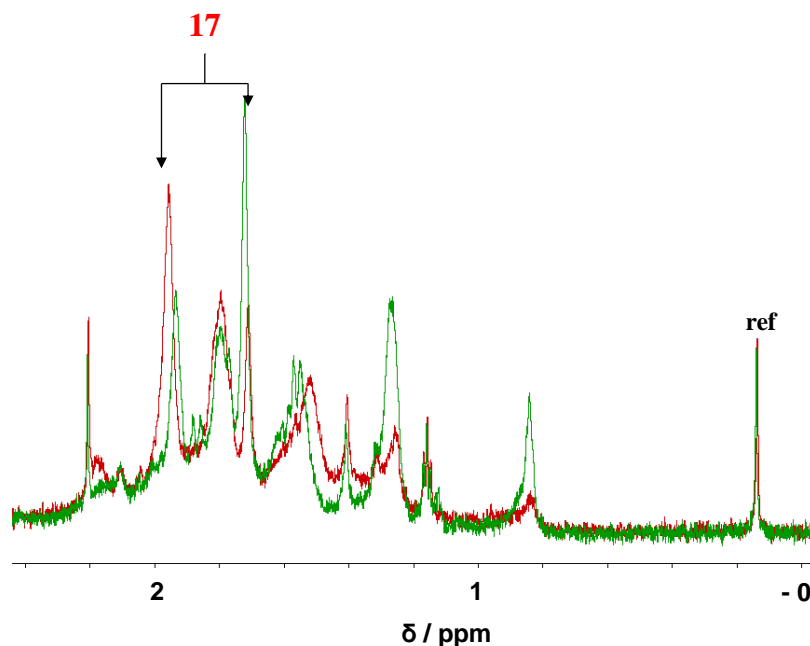


Figure 2.33 : Spectre RMN ^1H du complexe $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ à pH 7,3 (rouge) et à pH 5 (vert).

En diminuant le pH de 7 à 5, la proportion des protons (H17) de l'espèce 2 est doublée, ce qui conforte la conclusion précédente : à pH 7 deux espèces co-existent, alors qu'à pH 5, on observe uniquement celle dont la chaîne lysine est rigide. Il est tout à fait plausible que la rigidité de cette forme conduise à une relaxivité légèrement plus élevée à pH 5, alors qu'à pH 7, la relaxivité est une valeur moyennée des deux espèces monoprotonnées en équilibre. Ce changement de rigidité entraîne vraisemblablement aussi des variations dans la contribution de la deuxième sphère à la relaxivité. Grâce à sa charge positive, l'amine est aussi entourée par des molécules de solvant qui seront plus rapprochées du centre paramagnétique dans l'espèce 2, conduisant à une contribution supplémentaire de la seconde sphère de coordination à la relaxation. La séparation des deux effets (rotation et deuxième sphère) reste difficile pour une analyse fiable des relaxivités. Néanmoins, pour illustrer quelle variation du temps de corrélation rotationnelle seule peut être responsable de la différence de relaxivité observée entre pH 7 et 5, les courbes NMRD ont été fittées sans considérer la contribution de la 2nd sphère. Cette analyse donne $\tau_{\text{rH}}^{298} = 124$ ps à pH 5, à comparer avec $\tau_{\text{rH}}^{298} = 100$ ps à pH 7. En effet, une telle augmentation semble improbable avec seulement la rigidification de la chaîne lysine, ce qui nous conforte dans l'hypothèse que la contribution de deuxième sphère est également importante.

Caractérisation du complexe $[Mn(L^1)]$ hautement inerte

En plus de ces facteurs, une légère augmentation de la vitesse d'échange d'eau est également observée à pH 5, comme l'indique l'analyse des données de RMN de ^{17}O (figure 2.34 ; tableau 2.6). Cette différence de k_{ex} n'aura par contre aucune conséquence pour les relaxivités.

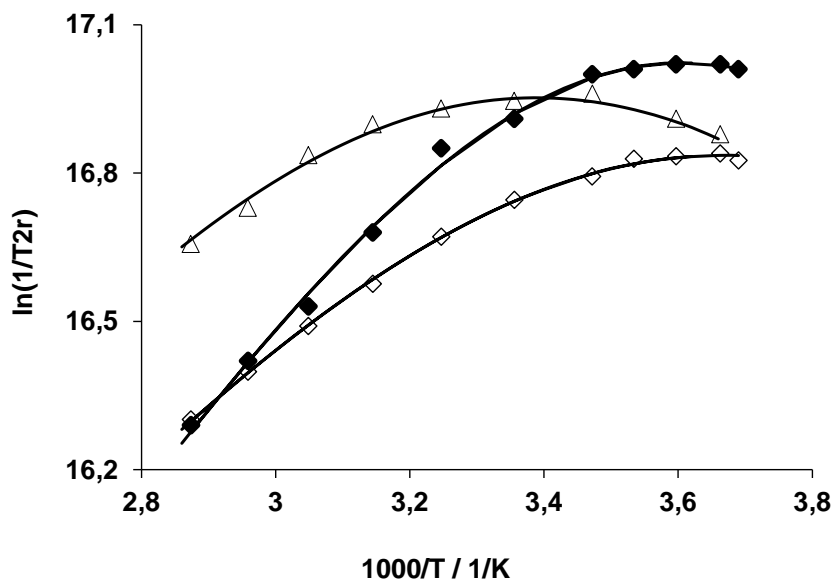


Figure 2.34 : Variation de la vitesse de relaxation transversale réduite de l'oxygène 17 en fonction de l'inverse de la température. Δ : pH 7,3 ; \blacklozenge : pH 6, en présence Zn^{2+} ; \diamond : pH 5, en absence Zn^{2+} . $c_{MnL} = 3,56-3,64$ mM. 400 MHz. Les courbes représentent les ajustements.

Tableau 2.6 : Propriétés de relaxation du complexe $[Mn(HL^1)]$ à pH 7,3 ; $[Mn(HL^1)]$ en absence de Zn^{2+} , pH 5 ; $[Mn(HL^1)]$ en présence de Zn^{2+} , pH 6 ; sans considération de la 2nd sphère de coordination.

	$k_{ex} / 10^7$ (s ⁻¹)	τ_{rH}^{298} (ps)	ΔH^\ddagger (kJ.mol ⁻¹)	$A_0/h / 10^6$ (rad.s ⁻²)	$\Delta^2 / 10^{-19}$ (s ⁻²)
$[Mn(HL^1)]$ pH 7,3	$5,1 \pm 0,7$	100 ± 5	$10,6 \pm 0,1$	$28,0 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$
$[Mn(HL^1)]$ pH 5, sans Zn^{2+}	$6,7 \pm 0,1$	124 ± 3	$9,5 \pm 0,2$	$25,0 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$
$[Mn(HL^1)]$ pH 6, avec Zn^{2+}	$8,2 \pm 0,2$	143 ± 3	$13,3 \pm 0,5$	$30,0 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,1$

En ce qui concerne la situation en présence du Zn^{2+} et à pH 6 (augmentation de 21 % de la relaxivité observée par rapport à pH 7 et sans Zn^{2+}), aucune étude RMN détaillée n'a été faite.

Dans ce cas, la coordination potentielle du Zn^{2+} aux sites coordinants du ligand, non-engagés dans la complexation du Mn^{2+} (carboxylate et ammonium de la lysine) pourraient également jouer un rôle. Ainsi la formation d'un complexe dinucléaire $[Mn(L^1)Zn]^+$ relativement stable peut être imaginée, qui, grâce à sa rigidité et son poids moléculaire légèrement plus élevé (poids du Zn^{2+} en plus), pourrait avoir une relaxivité plus haute.

La situation s'est révélée encore plus complexe. La coordination de l'amine de la lysine au Zn^{2+} a bien pu être mise en évidence par titrage potentiométrique du complexe $[Mn(HL^1)]$, préparé préalablement à pH 7, en présence d'un équivalent de Zn^{2+} (figure 2.35-a). Au début de ce titrage, une solution de $ZnCl_2$ est rajoutée à l'échantillon contenant $[Mn(HL^1)]$ à pH 7, ce qui provoque une diminution immédiate du pH à 3,7 (premier point de la courbe bleu pâle : figure 2.35-a). Cette diminution prouve la formation d'un complexe entre $[Mn(HL^1)]$ et le Zn^{2+} , accompagnée d'une perte de protons, ce qui implique forcément ceux de l'amine de la lysine. En titrant cet échantillon par une base, deux points d'inflexion sont observés sur la courbe, avant qu'une précipitation commence à apparaître vers pH 9,8 (où on arrête le titrage). Le premier saut correspond à la consommation d'un demi-équivalent de base par ligand (et par Zn^{2+}). Ce résultat très surprenant suggère que seulement la moitié de la teneur totale en protons de l'amine de la lysine est titrée, ce qui laisse penser à la formation d'une espèce dimère reliée par le Zn^{2+} , comme représentée sur la figure 2.36. Eventuellement, on peut penser que des deux espèces de $[Mn(HL^1)]$ identifiées en RMN à pH 7 (selon la rigidité de la chaîne lysine), l'une est plus apte à la déprotonation de la lysine pour complexer le Zn^{2+} ; cette déprotonation se passe à $pH < 4.5$). Par la suite du titrage, après l'ajout d'exactly deux équivalents supplémentaires de base, un second point d'équivalence est observé sur la courbe de titrage (vers pH 8,8). Pour expliquer ce scénario, nous pouvons faire l'hypothèse de la formation d'une espèce dimère de composition $(Mn(L^1)Zn)_2(OH)_3$ qui soit assez stable (jusqu'à pH 9,8 où la précipitation commence). Dans ce dimère, les amines primaires des lysines sont déprotonnées, en plus trois hydroxydes doivent être également impliqués dans la coordination du Zn^{2+} étant donné la consommation de base (2,5 équivalents par ligands et par Zn^{2+}).

Pour compléter les informations sur ce système, nous avons également mesuré des relaxivités dans les solutions $[Mn(HL^1)] + Zn^{2+}$ à différents pH (figure 2.35-b). Cette courbe montre encore une fois que la relaxivité de $[Mn(HL^1)]$ est plus élevée en présence du Zn^{2+} , mais on observe également une légère augmentation de r_1 du système $[Mn(HL^1)] + Zn^{2+}$ quand on passe du pH 4 à pH 6, ce qui peut être la conséquence de la formation de l'espèce dimère.

La figure 2.36 illustre les différentes espèces impliquées dans cette hypothèse.

Caractérisation du complexe $[\text{Mn}(\text{L}^1)]$ hautement inerte

En résumé, le complexe $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$, en fonction du pH et de la présence de Zn^{2+} , génère des situations très complexes. Néanmoins, l'ensemble des études RMN, relaxométriques et potentiométriques nous a permis de tirer un certain nombre de conclusions :

1. La RMN des complexes de Mn^{2+} , contrairement à ce que l'on peut penser à première vue, peut être très informative.
2. A pH 7, le complexe $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ a deux formes distinctes dont la chaîne lysine a une rigidité différente. A pH 5, l'espèce avec la chaîne rigide est prédominante, ce qui explique la légère variation de relaxivité en fonction du pH.
3. $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ est capable de complexer le Zn^{2+} , avec la participation de l'amine de la lysine, de façon relativement stable. L'hypothèse de la formation des dimères impliquant des ligands de type hydroxo est une explication plausible des résultats expérimentaux.

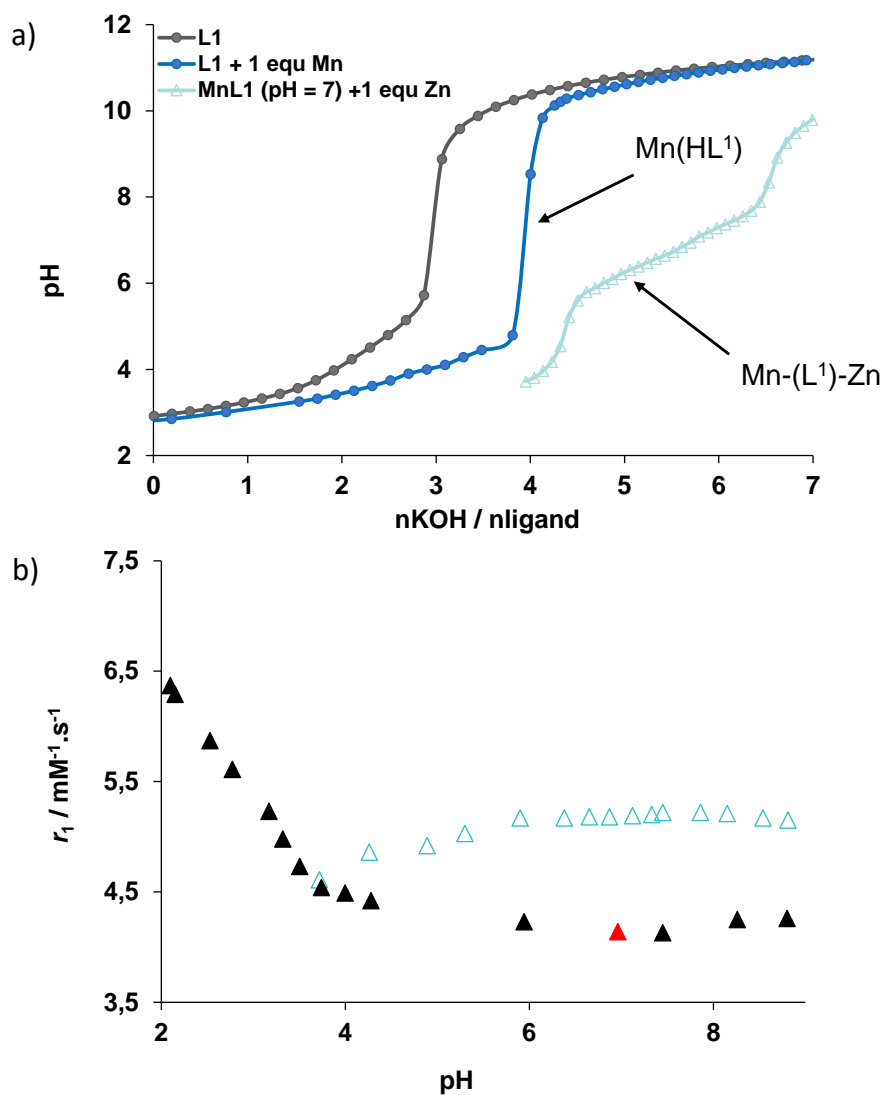


Figure 2.35 : a) Courbes de titrage potentiométrique ; b) Variation de la relaxivité en fonction du pH (▲ : r_1 [Mn(HL¹)] en absence de Zn²⁺ ; ▲ : r_1 [Mn(HL¹)] à pH 7,4 ; △ : [Mn(HL¹)] + 1 equ Zn²⁺. 60 MHz 25°C.

Caractérisation du complexe $[\text{Mn}(\text{L}^1)]$ hautement inerte

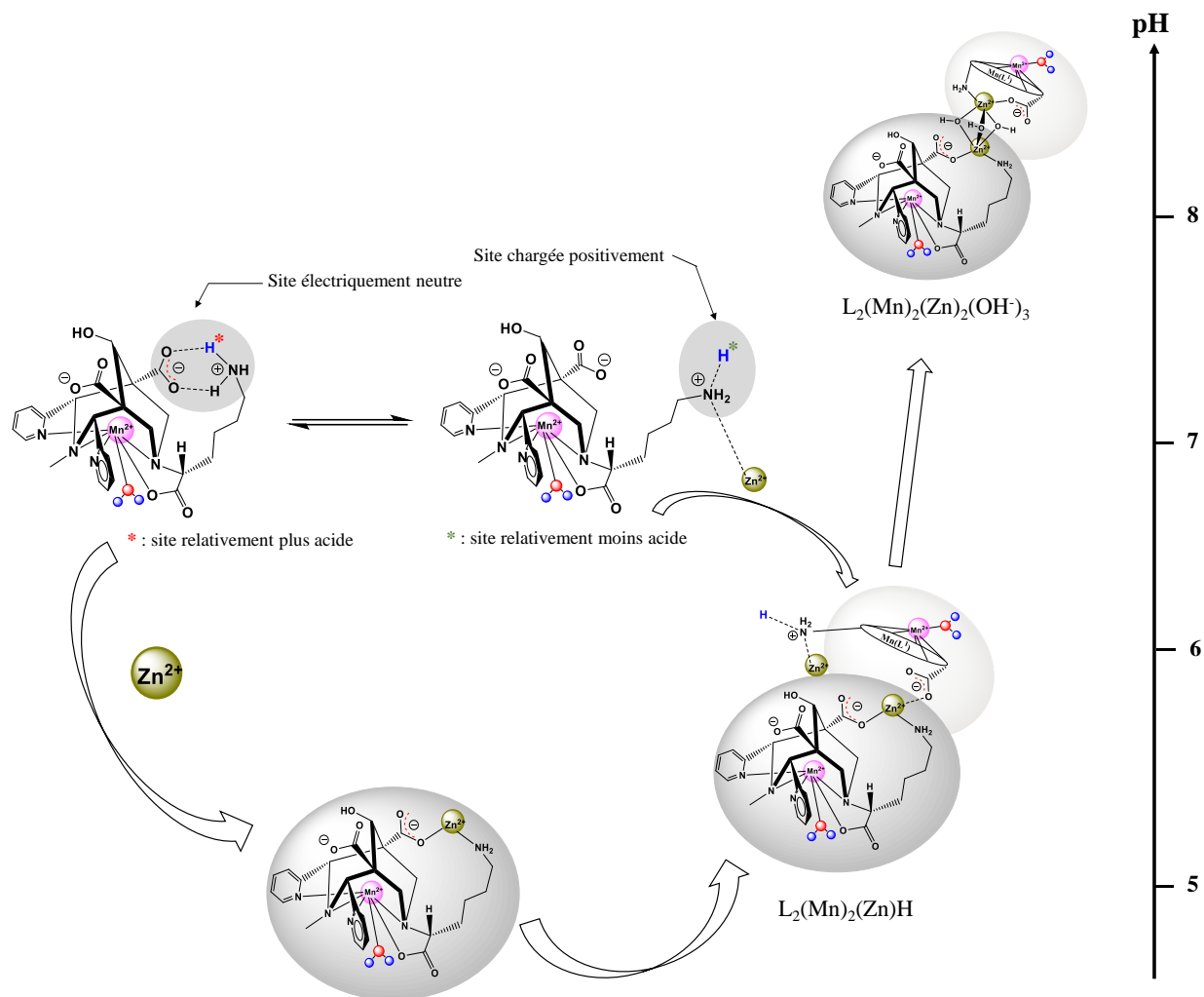


Figure 2.36 : Illustration des espèces chimiques supposées en fonction du pH.

Tableau 2.7 : Relaxivité et propriétés microscopiques.

	$\text{Mn}(\text{L}^1) / \text{pH } 7$	$\text{Mn}(\text{L}^1) / \text{pH } 5$	$\text{Mn}(\text{L}^1)\text{Zn} / \text{pH } 6$
$r_1 / \text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ^a	4,14	4,63 ($\Delta r_1 = 12 \%$)	5,35 ($\Delta r_1 = 29 \%$)
$k_{\text{ex}}^{298} / 10^7 \text{ s}^{-1}$	5,1(7)	6,7(1)	8,2(2)
$\tau_{rH}^{298} / \text{ps}$	100(5)	124(3)	143(3)

^a 60 MHz, 25 °C.

6. Etude de biodistribution et pharmacocinétique du complexe $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$

A l'issue des caractérisations physico-chimiques du complexe $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$, révélant des propriétés très intéressantes, des études *in vivo* (IRM) et *ex vivo* (ICP-OES) ont été réalisées chez des souris saines (n=4). Pour ces évaluations, le complexe a été injecté à une dose de 0,06 mmol/kg, dose 40 % inférieure à celle utilisée en diagnostic clinique.¹⁸⁻²¹

6.1. Etude *in vivo* (IRM) : Pharmacocinétique

Une étude *in vivo* a été faite sur des souris saines (n=4), afin d'évaluer les paramètres pharmacocinétiques, tels que la clairance et le temps de demi-vie plasmique du complexe $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$. Des organes, comme le rein, le foie, le muscle, et aussi l'aorte ont été sélectionnés pour suivre l'évolution de l'intensité du signal IRM normalisée, en fonction du temps.

La figure 2.37 représente l'évolution du signal IRM normalisé et les images correspondantes des organes considérés.

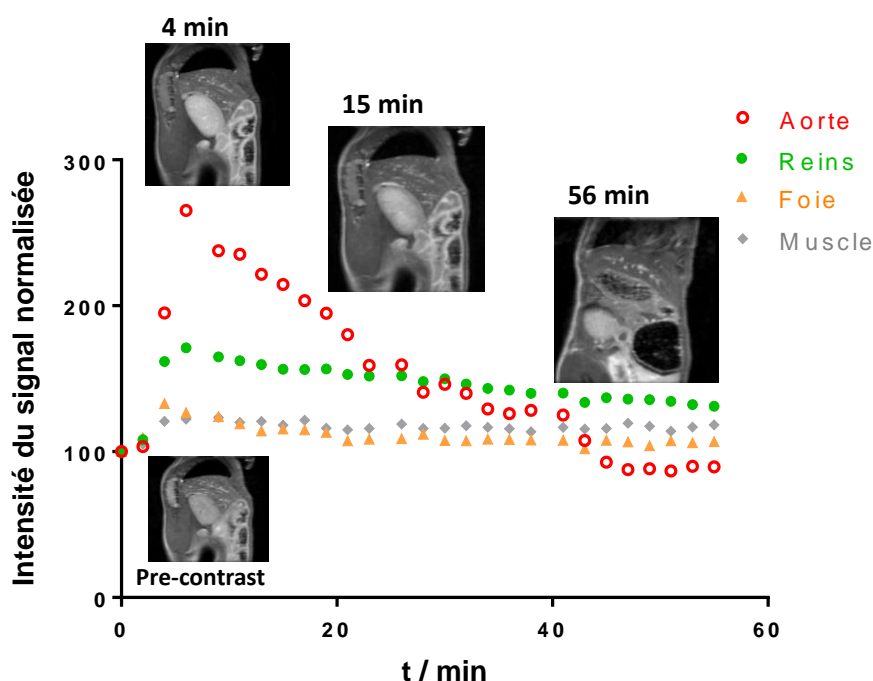


Figure 2.37 : Evolution du signal IRM normalisé des organes sélectionnés de la souris et les images correspondantes en fonction du temps, après injection de $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ à une dose de 0,06 mmol/kg.

Caractérisation du complexe $[Mn(L^1)]$ hautement inerte

Nous notons une augmentation significative de l'intensité du signal IRM normalisée au bout de 4 min dans l'aorte et au niveau des reins, suivie de sa diminution en fonction du temps. Le signal hyperintense observé au niveau des reins reflète une clairance rénale. Le temps de demi-vie du complexe dans la circulation sanguine est estimé à 21 min. Ce temps correspond à celui des molécules de petite taille.²²⁻²⁵ Ces résultats indiquent une élimination rapide du complexe sans rétention notable.

6.2. Etude *ex vivo* (ICP-OES) : Biodistribution

Au bout d'une heure et trente minutes, les souris ont été sacrifiées et les organes prélevés, tels que, le cerveau, le foie, le muscle, l'os, le poumon, la rate, les reins et aussi du sang. La biodistribution quantitative du complexe $[Mn(HL^1)]$ a été évaluée en déterminant les quantités de manganèse à l'aide d'un spectrophotomètre à plasma à couplage inductif (ICP). En vue de la présence endogène de manganèse, le teneur de Mn dans des organes des souris contrôles qui n'ont pas reçu d'injection a aussi été analysé.

La figure 2.38 illustre la teneur en manganèse des organes et du sang prélevés.

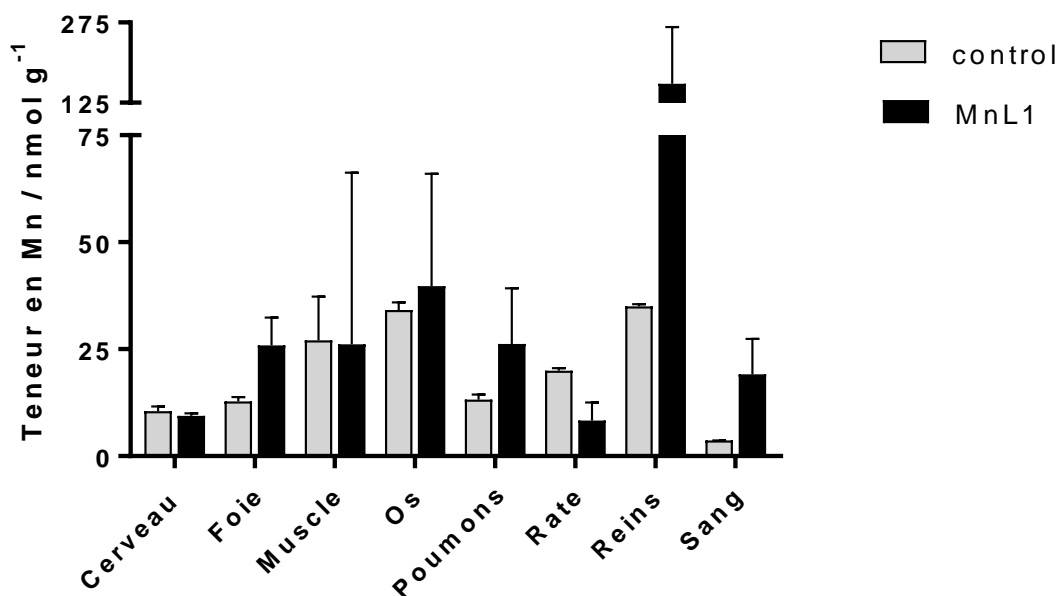


Figure 2.38 : Quantification ICP-OES ex vivo de la teneur tissulaire en Mn des principaux organes et sang des souris témoins et injectées avec $[Mn(HL^1)]$ (1,5 h post-injection).

On note l'accumulation du complexe $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ au niveau des reins, confortant la clairance rénale observée lors des études *in vivo* (IRM). À noter que l'élimination du manganèse « libre » se fait par voie hépatobiliaire.²⁶⁻²⁷ Nous observons la rétention d'une certaine quantité du complexe dans le sang, qui pourrait être due à la liaison de ce dernier avec l'albumine.

En effet, à 20 MHz, 37°C, en présence de HSA (human albumin serum), on a une augmentation de 51 % de la relaxivité.

7. Radiomarquage du ligand L^1 par le $^{52}\text{Mn}^{2+}$

Le $^{52}\text{Mn}^{2+}$ a des propriétés de désintégration intéressantes pour des applications en tomographie par émission de positons (TEP) : $t_{1/2} = 5,6$ j ; énergie max $\beta^+ = 575$ keV. Grâce à sa faible intensité de désintégration β^+ (29,6 %), une bonne résolution de 1,2 mm peut être obtenue, ce qui est particulièrement important pour l'imagerie du petit animal.²⁸ Son temps de demi-vie assez long rend le $^{52}\text{Mn}^{2+}$ particulièrement adapté à la conception de radiotraceurs couplés avec des molécules biologiques de grand poids moléculaire dont la biodistribution est lente et nécessite un temps d'observation long (par exemple des anticorps).

De plus, le manganèse (Mn^{2+}) est le seul métal offrant la possibilité de faire une imagerie bimodale (complexes de $^{55}\text{Mn}^{2+}$: agent de contraste IRM / complexes $^{52}\text{Mn}^{2+}$: radiotraceur pour la TEP).²⁹

Ainsi, en collaboration avec Isidro Da Silva, du cyclotron du CEMHTI, CNRS, Orléans, pour la production du $^{52}\text{Mn}^{2+}$, nous avons réalisé le radiomarquage du ligand L^1 et d'un dérivé portant une fonction de ciblage, suivi d'une étude de stabilité des complexes dans différents milieux et d'une étude de biodistribution *ex vivo* chez des souris porteuses de tumeurs colorectales orthotopiques avec un dérivé de L^1 bio-fonctionnalisé.

La production du $^{52}\text{Mn}^{2+}$ a été réalisée pour la première fois en France, à l'occasion de ces études.

7.1. Radiomarquage et étude de stabilité

7.1.1. Radiomarquage du ligand L^1

Le $^{52}\text{Mn}^{2+}$ est produit par irradiation d'une cible de chrome par un faisceau de protons, afin de provoquer une réaction nucléaire $^{52}\text{Cr}(\text{p}, \text{n})^{52}\text{Mn}$.

Les étapes de la production sont décrites dans la partie expérimentale.

Le radiomarquage du ligand L^1 par le $^{52}\text{Mn}^{2+}$ est réalisé suivant deux méthodes : (1) soit en utilisant le Mn^{2+} en solution acide (pH 1) et par la suite, nous remontons le pH ; (2) soit après évaporation du solvant (à sec) à la suite de la dernière étape de purification du ^{52}Mn , repris en tampon.

➤ Par la première méthode : $^{52}\text{Mn}^{2+}$ en solution

En présence d'acide ascorbique, pour éviter une éventuelle oxydation du manganèse, on ajuste le pH vers 7, avec du NaOH. Puis, on rajoute une certaine quantité du ligand L^1 , afin d'obtenir le ratio $\text{L}^1/^{52}\text{Mn}^{2+}$ souhaité.

Le tableau 2.7 ci-après représente les différentes conditions de marquage testées.

➤ Par la deuxième méthode : $^{52}\text{Mn}^{2+}$ à sec

Après avoir évaporé le solvant, le $^{52}\text{Mn}^{2+}$ est repris dans une solution tampon HEPES (pH 7) de la concentration 0,1 M.

Puis, comme précédemment, on rajoute une quantité de ligand, pour obtenir le ratio souhaité.

Tableau 2.8: Conditions de marquage du ligand L¹ par le ⁵²Mn²⁺ testées.

	Ratio : ⁵² Mn ²⁺ /L ¹	Nbre de moles L ¹	Nbre de moles ⁵² Mn ²⁺	Activité (MBq)	pH	T (°C)	Temps	Rendement : η
⁵² Mn ²⁺ en solution (1)	1/2	7,00×10 ⁻¹²	3,4×10 ⁻¹²	2,67	7	90	2 h 30 min	3%
- (2)	1/5	1,60×10 ⁻¹¹	3,03×10 ⁻¹²	2,65	7	90	2 h 30 min	8%
- (2)	1/5	1,60×10 ⁻¹¹	3,03×10 ⁻¹²	2,65	4	T° ambiante	18 h	20%
- (5)	1/50	1,67×10 ⁻¹⁰	2,85×10 ⁻¹²	2,50	7	90	3 h	100%
- (7)	1/1000	3,01×10 ⁻⁰⁹	3,01×10 ⁻¹²	2,65	7	90	1 h	100%
- (6)	1/1000	3,01×10 ⁻⁰⁹	3,01×10 ⁻¹²	2,65	6	90	1 h	70%
⁵² Mn ²⁺ à sec (3)	1/5	1,60×10 ⁻¹¹	3,02×10 ⁻¹²	2,66	7	90	4 h	40%
- (4)	1/10	3,70×10 ⁻¹¹	3,02×10 ⁻¹²	2,65	7	90	3 h	100%

Le radiomarquage est suivi par TLC, en utilisant différents éluants. La figure 2.39 représente les TLC, les conditions d'éluion et les R_f des différentes espèces.

Le rendement du radiomarquage est fonction du ratio, du pH, de la température et de la méthode utilisée.

Nous observons que les meilleurs rendements de radiomarquage avec un ratio minimal sont obtenus avec la deuxième méthode, avec laquelle nous récupérons le ⁵²Mn dans une solution tampon (HEPES).

Avec cette méthode, nous parvenons à obtenir un rendement de radiomarquage de 100 %, en utilisant un ratio de 1/10 : ⁵²Mn²⁺/L¹, pH 7, 90 °C, après 3 h de réaction.

Caractérisation du complexe $[Mn(L^1)]$ hautement inerte

À noter que dans la plupart des cas, les radiomarquages sont réalisés avec un large excès du ligand. Alors, à pH 7, nous avons obtenu la formation complète du radiocomplexe, ce qui est en accord avec les courbes de biodistribution des espèces en fonction du pH obtenues avec l'isotope naturel. La durée de 3 h de radiomarquage reste raisonnable étant donné la longue demi-vie du $^{52}Mn^{2+}$.

Une fois le radiocomplexe formé, il est utilisé pour des études *in vitro*, et pour la détermination de la lipophilie.

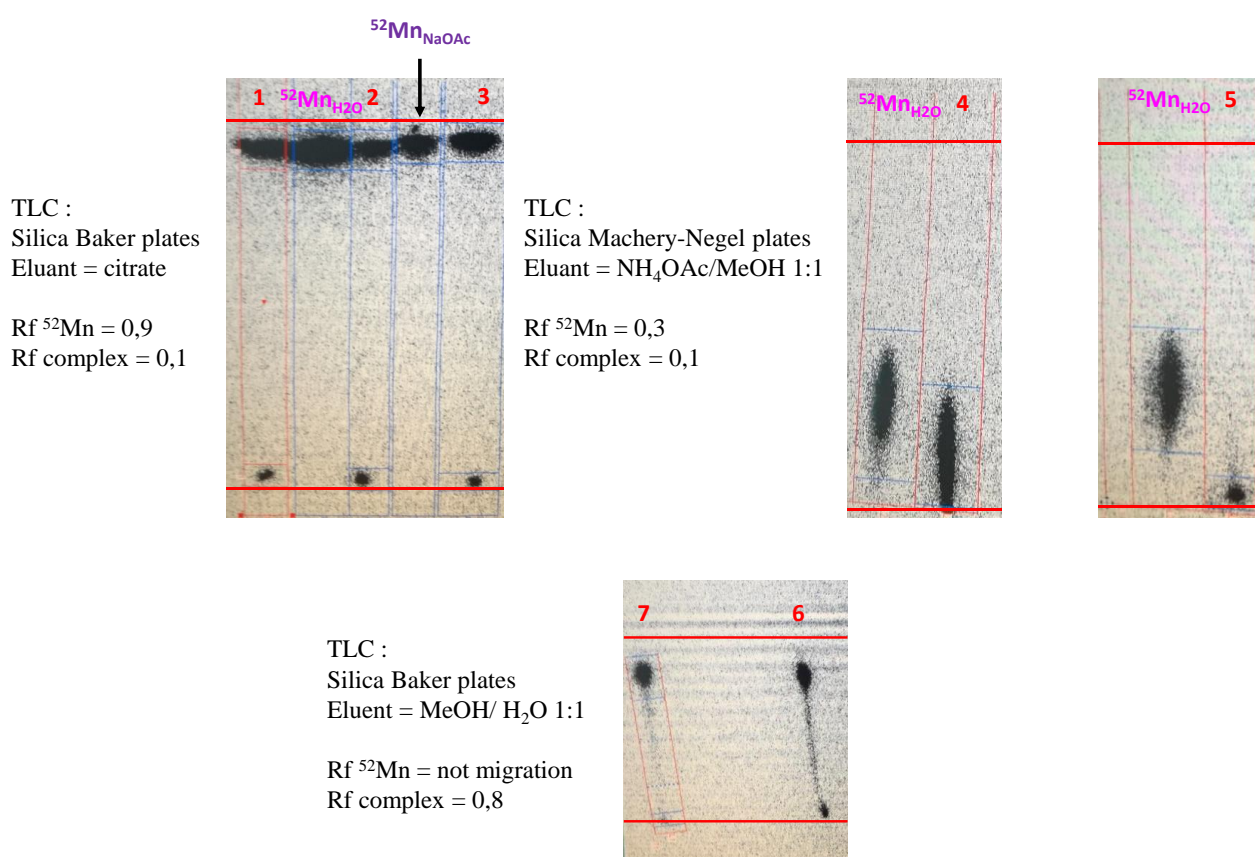


Figure 2.39 : TLC de suivi des radiomarquages, les chiffres représentent le numéro des conditions expérimentales (voir tableau 2.7).

7.1.2. Etude de stabilité

La stabilité du radiocomplexe a été évaluée dans différents milieux, tels que l'eau, saline (0,9 % NaCl), PBS (phosphate buffered saline) et HSA (human serum albumin), en fonction du temps (1, 18 et 24 h) par TLC.

La figure 2.40 illustre leur évolution dans chaque milieu.

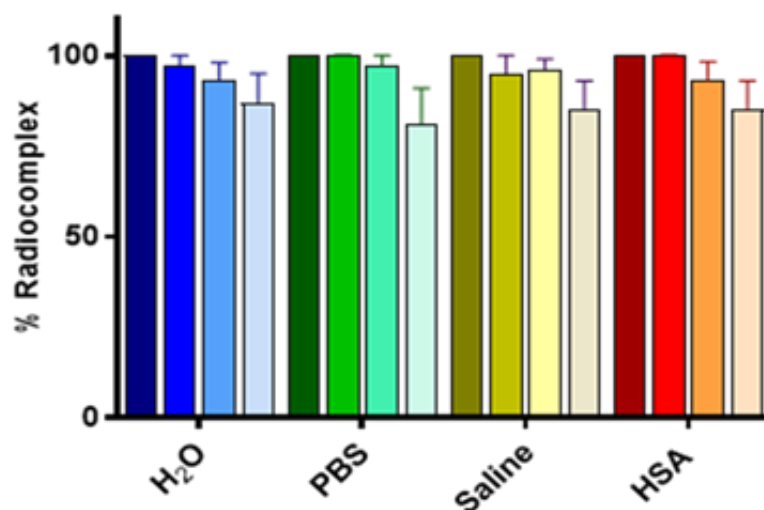


Figure 2.40 : Stabilité du radiocomplexe [⁵²Mn(L¹)] dans différents milieux, à pH 7, à différents temps (0, 1, 18 et 24 h).

Nous observons une légère diminution de la quantité du radiocomplexe (~13 %) en moyenne au bout de 24 h, quel que soit le milieu.

Néanmoins, nous observons une bonne stabilité du complexe dans ces différents milieux.

Les études de lipophilie montrent que le radiocomplexe [⁵²Mn(HL¹)] est hautement hydrophile avec un $\log P = -1,96 \pm 0,06$, se trouvant dans la même gamme de ceux des agents de contraste à base de Mn²⁺, comme le [Mn(DPDP)]⁴⁻ ou [Mn(EDTA-BTA)]²⁻, avec respectivement des valeurs $\log P$ de -3,07 et -1,84³⁰.

7.2. Etude *ex vivo* : [⁵²Mn(L¹-RGD)]

Dans le but d'une validation biologique de la bispidine L¹, nous avons fonctionnalisé cette dernière avec un peptide de type RGD cyclique, connu pour cibler les intégrines surexprimées sur les membranes cellulaires tumorales. Nous avons ainsi réalisé une étude de biodistribution

Caractérisation du complexe $[Mn(L^1)]$ hautement inerte

du ligand L^1 -RGD chez trois souris femelles SWISS nues, porteuses de tumeurs colorectales orthotopiques. Ces tumeurs ont été induites par des cellules de type HCT116 (cellules humaines de cancer colorectal), implantées au niveau de la paroi du cæcum (première partie du côlon).

Le choix du RGD cyclique comme motif de ciblage permet de cibler plusieurs types d'intégrines, dont $\alpha\beta 5$ et $\alpha\beta 6$, surexprimées par ce type de cellules.³¹

Cependant, nous sommes conscients que ce motif de ciblage n'est pas le plus adapté pour les radiocomplexes à base de $^{52}Mn^{2+}$ (sa demi-vie longue serait plus adaptée pour des motifs de longue distribution tels que les anticorps), mais à l'occasion, nous l'avons à notre disposition.

La bispidine L^1 ciblée (L^1 -RGD) est obtenue à partir d'un dérivé L^1 -maléimide (synthétisé par nos collaborateurs à Strasbourg), suite à une addition nucléophile 1-4 de la cystéine RGD sur la liaison double du groupement carbonyle α,β -insaturé du maléimide (figure 2.41), suivie d'une tautomérisation céto-énolique.

Elle est purifiée par Prep-HPLC et caractérisée par LC-MS (voir partie expérimentale).

Nous avons réalisé l'hémisynthèse de ce ligand au CBM, en collaboration avec l'équipe du Dr. Vincent Aucagne.

Par la suite, le L^1 -RGD est mélangé avec du $^{52}Mn^{2+}$, sous un ratio $^{52}Mn^{2+} / L^1$ -RGD : 1 / 1000, à pH 7, 70 °C, pendant 3 h, pour obtenir le radiocomplexe ciblé $^{52}Mn(L^1$ -RGD) avec un rendement supérieur à 97 %.

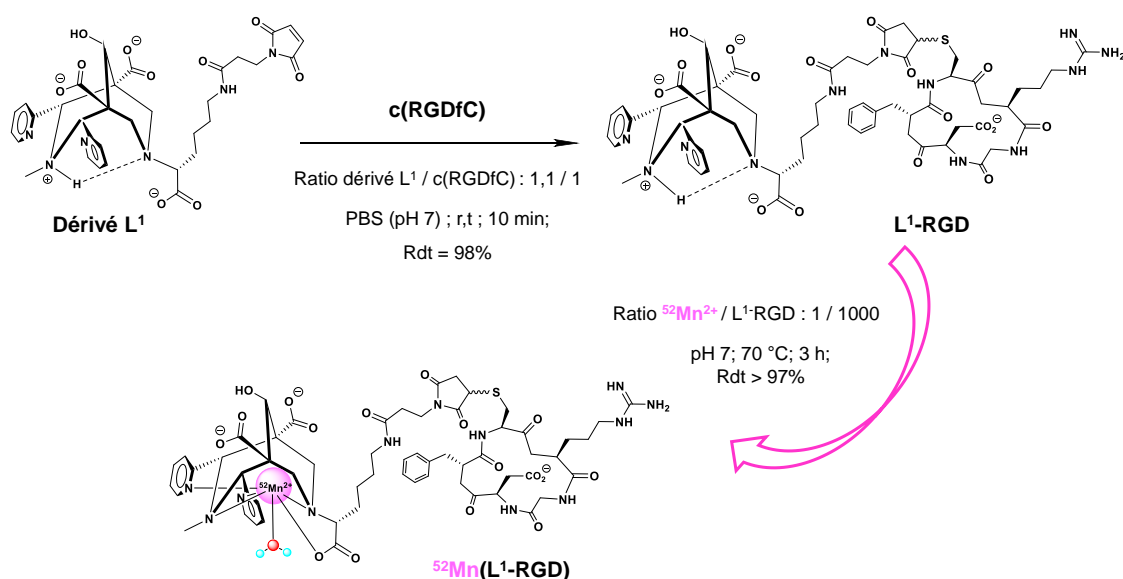


Figure 2.41 : Schéma de synthèse du radiocomplexe $[^{52}Mn(L^1$ -RGD)].

Une fois le radiocomplexe formé, nous avons injecté chaque souris une solution du radiocomplexe contenant environ 2 MBq d'activité.

Au bout de 4 h, les souris ont été sacrifiées et les organes d'intérêts récupérés pour faire une étude de biodistribution.

La figure 2.42 ci-après illustre cette biodistribution. Les données sont représentées en % de dose injectée par poids d'organe.

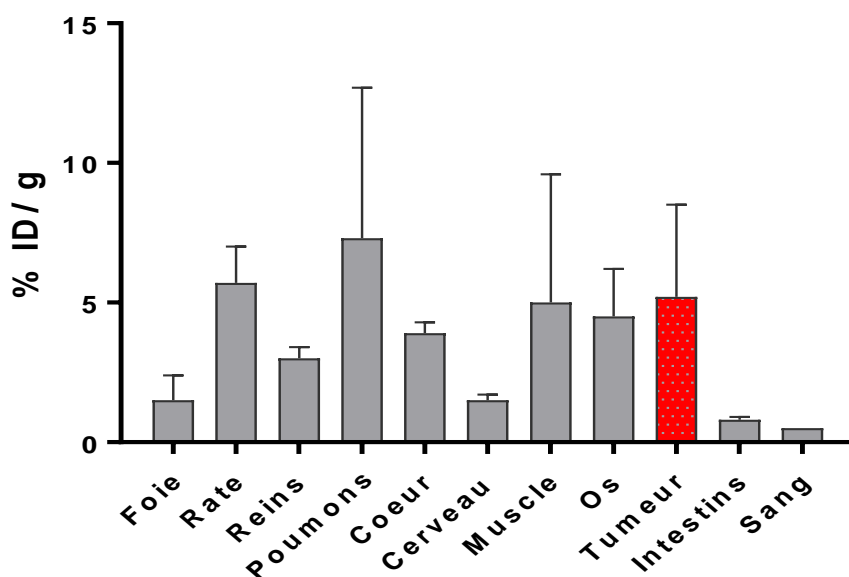


Figure 2.42 : Biodistribution ex vivo du $[^{52}\text{Mn}(\text{L}^1\text{-RGD})]$ dans les organes d'intérêts et du sang à 4 h post-injection.

Nous observons une clairance rapide, accompagnée d'une excrétion plutôt rénale du radiocomplexe, suggérée par les faibles absorptions au niveau du foie, intestins et rate. Le profil de biodistribution ne montre pas d'accumulation particulière dans le sang, le cœur et le foie ; organes typiques de fixation du $^{52}\text{Mn}^{2+}$ « libre ». ³²

Une fixation tumorale assez prometteuse est obtenue. Pour une meilleure exploitation de ces résultats, nous avons analysé la fixation tumorale en termes de la taille des tumeurs, et calculé le ratio de fixation entre les tumeurs et des organes/tissu d'intérêt. Le tableau 2.8 représente les données numériques obtenues.

Caractérisation du complexe [Mn(L¹)] hautement inerte

Tableau 2.9: Données de la fixation tumorale du [⁵²Mn(L¹-RGD)] et du ratio tumeur / intestin ou sang.

	Poids (g)	Fixation tumorale (%ID/g)	Ratio tumeur / intestin	Ratio tumeur / sang
Souris 1	0,458	1,7	2,2	3,1
Souris 2	0,116	5,8	6,9	12,2
Souris 3	0,081	8,3	8,9	15,0

Malgré le même temps écoulé entre l'implantation des cellules tumorales et les études de biodistribution, les trois souris étudiées présentaient des tumeurs de poids différent. Il est intéressant de remarquer que la fixation tumorale la plus élevée est observée avec la plus petite tumeur. Ceci est en accord avec l'expression plus importante d'intégrine dans des états plus précoces de développement tumoral.³¹ Par ailleurs, un bon ratio entre la fixation dans les tumeurs et l'intestin ou le sang, laisse prévoir un bon contraste de la tumeur *in vivo*.

Alors, ces résultats sont prometteurs et valident le ciblage réalisé avec la bispidine L¹.

Néanmoins, d'autres études doivent être faites avec plus de souris portant des tumeurs de même taille pour le produit L¹-RGD, et idéalement en utilisant d'autres motifs de ciblage plus adapté au ⁵²Mn.

Conclusion

En dépit de sa stabilité modeste, le complexe $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ est doté d'une inertie inédite, lui valant le titre du complexe de Mn^{2+} hydraté le plus inerte connu à ce jour.

A pH 6, en présence de 50 équivalents de Zn^{2+} , 37 °C, on observe aucune dissociation du complexe pendant au moins 5 mois.

En plus, cette inertie cinétique exceptionnelle est accompagnée d'une bonne relaxivité ($r_1 = 4,14 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 60 MHz, 25 °C) pour un complexe de Mn^{2+} monohydraté de petite taille.

Par le biais de la RMN, nous avons démontré qu'à pH physiologique le $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ est présent sous deux formes distinctes qui diffèrent par la rigidité de la chaîne lysine ; et à pH 5, l'espèce dont la chaîne lysine est rigide prédomine.

L'étude *in vivo* réalisé en IRM chez des souris saines a suggéré que la clairance du $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ est rénale. Le complexe a un temps de demi-vie dans la circulation sanguine de 21 min. L'étude de biodistribution *ex vivo* (ICP-OES) a permis d'évaluer la teneur en Mn des organes d'intérêt au bout d'une heure trente minutes et conforte les résultats obtenus en *in vivo*, c'est-à-dire une élimination rapide et complète.

Nous avons réussi à radiomarquer la bispidine L^1 avec un rendement de 100 %, et on note une bonne stabilité du radiocomplexe dans différents milieux.

Un dérivé du L^1 portant une unité de ciblage biologique (c(RGDfC)) a été synthétisé, dont nous avons injecté le radiocomplexe de $^{52}\text{Mn}^{2+}$ à des souris porteuses de tumeurs colorectales orthotopiques. Nous avons obtenu une bonne fixation tumorale vis-à-vis des autres organes, plus particulièrement de l'intestin.

Tous ces résultats sont attrayants et prometteurs pour la conception de sondes destinées à l'imagerie bimodale IRM / TEP.

Suite à ces résultats très intéressants, nous avons décidé d'explorer d'autres ligands de type bispidine penta-, et hexa-dentés, afin d'établir une relation entre leurs structures et les propriétés physico-chimiques des complexes de Mn^{2+} qu'ils forment.

Référence

1. Gale, E. M.; Atanasova, I. P.; Blasi, F.; Ay, I.; Caravan, P., A Manganese Alternative to Gadolinium for MRI Contrast. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (49), 15548-15557.
2. Molnar, E.; Varadi, B.; Garda, Z.; Botar, R.; Kalman, F. K.; Toth, E.; Platas-Iglesias, C.; Toth, I.; Brucher, E.; Tircso, G., Remarkable differences and similarities between the isomeric Mn(II)-cis- and trans-1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetate complexes. *Inorganica Chimica Acta* **2018**, *472*, 254-263.
3. Botár, R.; Molnár, E.; Trencsényi, G.; Kiss, J.; Kálmán, F. K.; Tircsó, G., Stable and Inert Mn(II)-Based and pH-Responsive Contrast Agents. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (4), 1662-1666.
4. Roux, A.; Gillet, R.; Huclier-Markai, S.; Ehret-Sabatier, L.; Charbonnière, L. J.; Nonat, A. M., Bifunctional bispidine derivatives for copper-64 labelling and positron emission tomography. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2017**, *15* (6), 1475-1483.
5. Price, T. W.; Yap, S. Y.; Gillet, R.; Savoie, H.; Charbonnière, L. J.; Boyle, R. W.; Nonat, A. M.; Stasiuk, G. J., Evaluation of a Bispidine-Based Chelator for Gallium-68 and of the Porphyrin Conjugate as PET/PDT Theranostic Agent. *Chemistry – A European Journal* **2020**, *26* (34), 7602-7608.
6. Legdali, T.; Roux, A.; Platas-Iglesias, C.; Camerel, F.; Nonat, A. M.; Charbonnière, L. J., Substitution-Assisted Stereochemical Control of Bispidine-Based Ligands. *The Journal of Organic Chemistry* **2012**, *77* (24), 11167-11176.
7. Canel, E.; Gültepe, A.; Doğan, A.; Kılıç, E., The Determination of Protonation Constants of Some Amino Acids and Their Esters by Potentiometry in Different Media. *Journal of Solution Chemistry* **2006**, *35* (1), 5-19.
8. Norrehed, S.; Erdélyi, M.; Light, M. E.; Gogoll, A., Protonation-triggered conformational modulation of an N,N'-dialkylbispidine: first observation of the elusive boat–boat conformer. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2013**, *11* (37), 6292-6299.
9. Pozdnyakov, I. P.; Pigliucci, A.; Tkachenko, N.; Plyusnin, V. F.; Vauthey, E.; Lemmetyinen, H., The photophysics of salicylic acid derivatives in aqueous solution. *Journal of Physical Organic Chemistry* **2009**, *22* (5), 449-454.
10. Sumar, I.; Ayers, P. W.; Matta, C. F., Electron localization-delocalization matrices in the prediction of pKa's and UV-wavelengths of maximum absorbance of p-benzoic acids and the definition of super-atoms in molecules. *Chemical Physics Letters* **2014**, *612*, 190-197.
11. Irving, H.; Williams, R. J. P., Order of Stability of Metal Complexes. *Nature* **1948**, *162* (4123), 746-747.
12. Gale, E. M.; Zhu, J.; Caravan, P., Direct Measurement of the Mn(II) Hydration State in Metal Complexes and Metalloproteins through O-17 NMR Line Widths. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (49), 18600-18608.
13. Berki, T. R.; Martinelli, J.; Tei, L.; Willcock, H.; Butler, S. J., Polymerizable Gd(III) building blocks for the synthesis of high relaxivity macromolecular MRI contrast agents. *Chemical Science* **2021**, *12* (11), 3999-4013.
14. Rolla, G. A.; Platas-Iglesias, C.; Botta, M.; Tei, L.; Helm, L., H-1 and O-17 NMR Relaxometric and Computational Study on Macrocyclic Mn(II) Complexes. *Inorganic Chemistry* **2013**, *52* (6), 3268-3279.
15. Borel, A.; Helm, L.; Merbach, A. E., Molecular Dynamics Simulations of MRI-Relevant Gd(III) Chelates: Direct Access to Outer-Sphere Relaxivity. *Chem.Eur.J.* **2001**, *7* (3), 600-610.
16. Troughton, J. S.; Greenfield, M. T.; Greenwood, J. M.; Dumas, S.; Wiethoff, A. J.; Wang, J.; Spiller, M.; McMurphy, T.; Caravan, P., Synthesis and Evaluation of a High Relaxivity Manganese(II)-based MRI contrast Agent. *Inorganic Chemistry* **2004**, *43*, 6313-6323.

17. Balogh, E.; He, Z.; Hsieh, W.; Liu, S.; Toth, E., Dinuclear complexes formed with the triazacyclononane derivative ENOTA(4-): High-pressure O-17 NMR evidence of an associative water exchange on Mn-2(II)(ENOTA)(H₂O)(2). *Inorganic Chemistry* **2007**, *46* (1), 238-250.
18. Alger, J. R.; Schaewe, T. J.; Lai, T. C.; Frew, A. J.; Vespa, P. M.; Etchepare, M.; Liebeskind, D. S.; Saver, J. L.; Kidwell, S. C., Contrast agent dose effects in cerebral dynamic susceptibility contrast magnetic resonance perfusion imaging. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* **2009**, *29* (1), 52-64.
19. Wagner, A.; Mahrholdt, H.; Thomson, L.; Hager, S.; Meinhardt, G.; Rehwald, W.; Parker, M.; Shah, D.; Sechtem, U.; Kim, R. J.; Judd, R. M., Effects of Time, Dose, and Inversion Time for Acute Myocardial Infarct Size Measurements Based on Magnetic Resonance Imaging-Delayed Contrast Enhancement. *Journal of the American College of Cardiology* **2006**, *47* (10), 2027-2033.
20. Silver, N. C.; Good, C. D.; Barker, G. J.; MacManus, D. G.; Thompson, A. J.; Moseley, I. F.; McDonald, W. I.; Miller, D. H., Sensitivity of contrast enhanced MRI in multiple sclerosis. Effects of gadolinium dose, magnetization transfer contrast and delayed imaging. *Brain* **1997**, *120* (7), 1149-1161.
21. Kramer, H.; Runge, V. M.; Naul, L. G.; Loynachan, A. T.; Reiser, M. F.; Wintersperger, B. J., Brain MRI With Single-Dose (0.1 mmol/kg) Gadobutrol at 1.5 T and 3 T: Comparison With 0.15 mmol/kg Gadoterate Meglumine. *American Journal of Roentgenology* **2010**, *194* (5), 1337-1342.
22. Cheng, H.-L. M.; Haedicke, I. E.; Cheng, W.; Tchouala Nofiele, J.; Zhang, X.-a., Gadolinium-free T1 contrast agents for MRI: Tunable pharmacokinetics of a new class of manganese porphyrins. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* **2014**, *40* (6), 1474-1480.
23. Oostendorp, M.; Douma, K.; Hackeng, T. M.; van Zandvoort, M. A. M. J.; Post, M. J.; Backes, W. H., Pharmacokinetics of contrast agents targeted to the tumor vasculature in molecular magnetic resonance imaging. *Contrast Media & Molecular Imaging* **2010**, *5* (1), 9-17.
24. Wieggers, C. B.; Welch, M. J.; Sharp, T. L.; Brown, J. J.; Perman, W. H.; Sun, Y.; Motekaitis, R. J.; Martell, A. E., Evaluation of two new gadolinium chelates as contrast agents for MRI. *Magnetic Resonance Imaging* **1992**, *10* (6), 903-911.
25. de Sousa, P. L.; Livramento, J. B.; Helm, L.; Merbach, A. E.; Meme, W.; Doan, B. T.; Beloeil, J. C.; Prata, M. I. M.; Santos, A. C.; Geraldles, C.; Toth, E., In vivo Mill assessment of a novel Gd-III-based contrast agent designed for high magnetic field applications. *Contrast Media & Molecular Imaging* **2008**, *3* (2), 78-85.
26. Islam, M. K.; Kim, S.; Kim, H. K.; Kim, Y. H.; Lee, Y. M.; Choi, G.; Baek, A. R.; Sung, B. K.; Kim, M.; Cho, A. E.; Kang, H.; Lee, G. H.; Choi, S. H.; Lee, T.; Park, J. A.; Chang, Y., Synthesis and Evaluation of Manganese(II)-Based Ethylenediaminetetraacetic Acid-Ethoxybenzyl Conjugate as a Highly Stable Hepatobiliary Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent. *Bioconjugate Chemistry* **2018**, *29* (11), 3614-3625.
27. Gallez, B.; Bacic, G.; Swartz, H. M., Evidence for the Dissociation of the Hepatobiliary MRI Contrast Agent Mn-DPDP. *Magnetic Resonance in Medicine* **1996**, *35*, 14-19.
28. Carter, L. M.; Kesner, A. L.; Pratt, E. C.; Sanders, V. A.; Massicano, A. V. F.; Cutler, C. S.; Lapi, S. E.; Lewis, J. S., The Impact of Positron Range on PET Resolution, Evaluated with Phantoms and PHITS Monte Carlo Simulations for Conventional and Non-conventional Radionuclides. *Molecular Imaging and Biology* **2020**, *22* (1), 73-84.
29. Lewis, C. M.; Graves, S. A.; Hernandez, R.; Valdovinos, H. F.; Barnhart, T. E.; Cai, W.; Meyerand, M. E.; Nickles, R. J.; Suzuki, M., ⁵²Mn production for PET/MRI tracking of human stem cells expressing divalent metal transporter 1 (DMT1). *Theranostics* **2015**, *5* (3), 227-39.
30. Islam, M. K.; Kim, S.; Kim, H.-K.; Park, S.; Lee, G.-H.; Kang, H. J.; Jung, J.-C.; Park, J.-S.; Kim, T.-J.; Chan, Y., Manganese Complex of Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)-Benzothiazole Aniline (BTA) Conjugate as a Potential Liver-Targeting MRI Contrast Agent. *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *60* (7), 2993-3001.

Caractérisation du complexe [Mn(L¹)] hautement inerte

31. Jin, H.; Varner, J., Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *British Journal of Cancer* **2004**, *90* (3), 561-565.
32. Man, F.; Gawne, P. J.; T.M. de Rosales, R., Nuclear imaging of liposomal drug delivery systems: A critical review of radiolabelling methods and applications in nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2019**, *143*, 134-160.

*Chapitre 3 : Etude de la relation entre la structure et les propriétés physico-chimiques des complexes Mn(**Bispidine**)*

Introduction

Suite à l'étude du $Mn(HL^1)$ qui a révélé des propriétés physico-chimiques très intéressantes, plus particulièrement une inertie inédite et une bonne relaxivité, l'exploration des ligands de type bispidine pour la complexation du Mn^{2+} a été élargie.

Sept nouveaux ligands, penta- ou hexa-dentés, ont été conçus pour permettre une variation rationnelle de la structure (figure 3.1). Notre objectif était avant tout de mieux comprendre le rôle des différentes fonctions chimiques pour atteindre une inertie exceptionnelle et une bonne efficacité de relaxation du complexe de Mn^{2+} . Nous avons également voulu voir si une amélioration de la stabilité du complexe était possible. Comme pour L^1 , nos collaborateurs de Strasbourg ont réalisé la synthèse des ligands et nous avons mené des études sur les ligands et leurs complexes de Mn^{2+} .

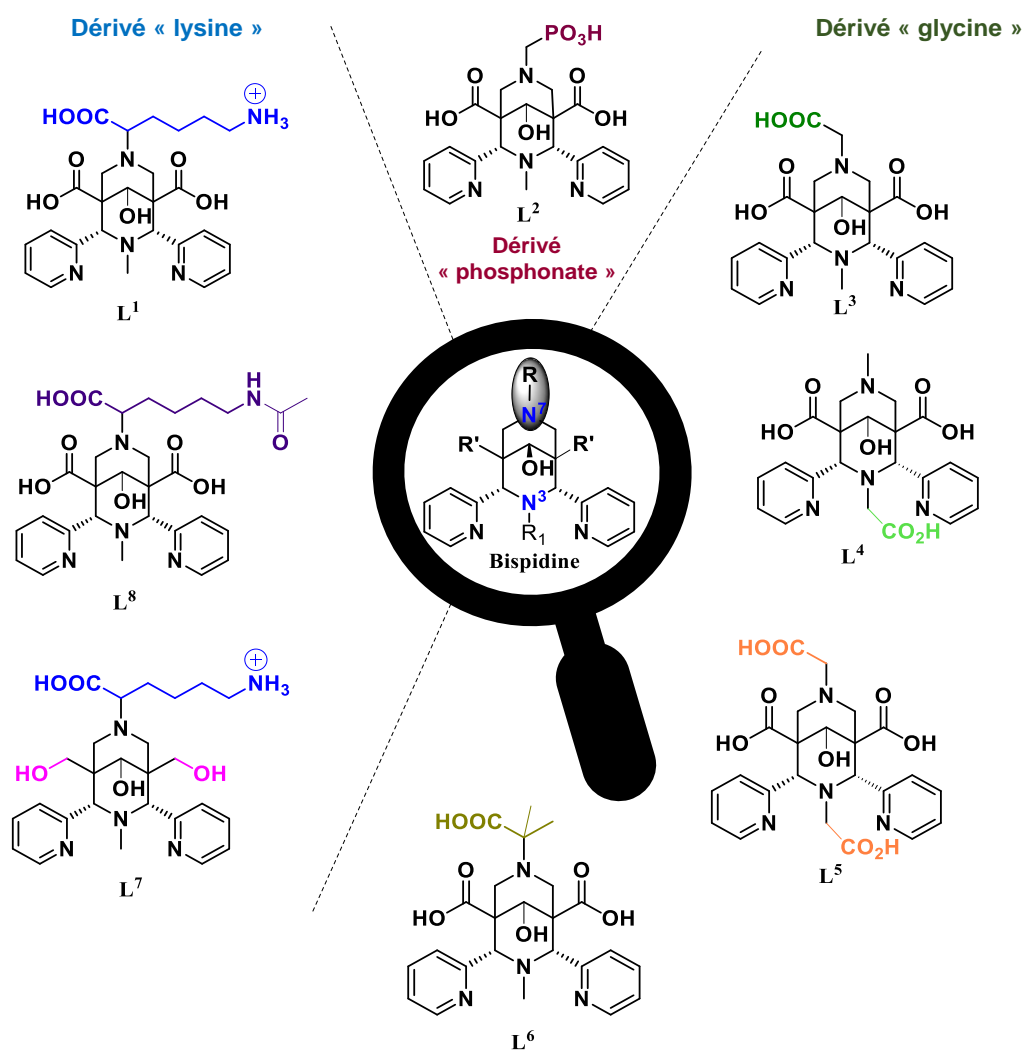


Figure 3.1 : Structures des bispidines étudiées.

Chapitre 3

Ces bispidines diffèrent par la nature et la position des groupements fonctionnels que porte le noyau bicyclique, plus particulièrement en positions N7 (et N3) des cycles pipéridines. En fonction de la nature de ce groupement fonctionnel, nous pouvons classer les bispidines étudiées dans ce chapitre en trois familles : les bispidines qui peuvent être considérées comme dérivées « lysine » (L^1 , L^7 et L^8), « glycine » (L^3 , L^5 , L^6 et nous avons classé dans ce groupe également L^4 qui est un isomère de position du ligand L^3) et « phosphonate » (L^2) (figure 3.1).

Au sein des bispidines considérées comme dérivés de la lysine, la variation structurale nous permettra d'étudier le rôle de la charge sur la lysine (comparaison L^1 et L^8) essentiellement pour l'inertie, ainsi que la contribution de l'effet de la deuxième sphère à la relaxivité (comparaison L^1 et L^7). Le groupement phosphonate (L^2) ainsi que l'introduction d'un carboxylate additionnel (L^5) peuvent apporter une augmentation de la stabilité du complexe. La variation de la position du groupement acétate qui porte un site coordinant (O), directement introduit sur le bicycle soit en position N7, soit en position N3, pourrait conduire à une différence importante dans la sphère de coordination du métal avec des conséquences sur les propriétés physico-chimiques. Enfin, l'introduction de deux groupements méthyle en position α du carboxylate portant un atome donneur (L^6) devrait engendrer une rigidification supplémentaire du ligand et peut-être une inertie accrue du complexe MnL.

Dans la famille des bispidines, la conformation du bicycle a un rôle primordial pour la formation des complexes. Alors, dans un premier temps et afin de caractériser la conformation du bicycle de nos ligands (chaise-chaise, chaise-bateau ou bateau-bateau), nous avons réalisé une étude RMN 1/2 D, combinée à la potentiométrie. Les résultats de cette étude seront particulièrement importants car ils permettent de prédire l'inertie des complexes de Mn^{2+} . Nous allons démontrer que l'inertie est étroitement liée à l'agencement des sites de coordination et surtout à la conformation de la molécule et la présence d'une cavité de coordination bicyclique qui en découlent (figure 3.2). En effet, cette cavité fortement pré-organisée et parfaitement adaptée à la coordination du Mn^{2+} par sa taille, que nous allons appeler « cavité bicyclique » par la suite, est essentielle pour obtenir des Mn(Bispidine) inertes ; comme en témoignent déjà les ligands macrocycliques (par exemple les dérivés cyclènes, cyclames¹⁻²) et macrobicycliques (les cryptands³⁻⁴) qui confèrent à leurs complexes une haute inertie. La conformation du bicycle permettra aussi d'expliquer d'autres phénomènes physico-chimiques.

Relation structure-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

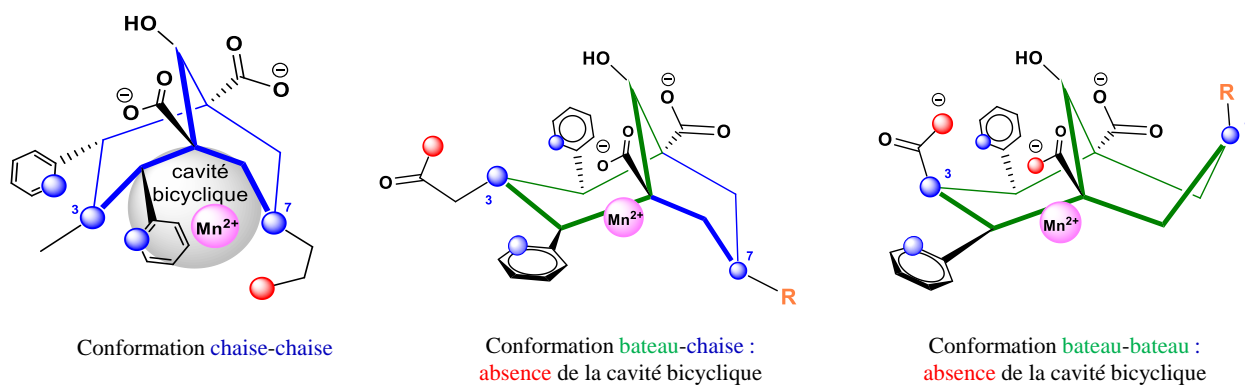


Figure 3.2 : Illustration des différentes conformations que peuvent adopter les bispidines. Seule la conformation chaise-chaise forme une « cage bicyclique » qui est généralement considérée comme favorable à la complexation des métaux.

De façon générale, la conformation bateau-bateau est très défavorable pour les bispidines. En revanche, des études ont démontré qu'en fonction de la nature du groupement fonctionnel en position N3, la conformation bateau-chaise peut être favorisée en raison de la gêne stérique des substituants et aux interactions intramoléculaires comme des liaisons hydrogène.⁵

À l'issue de cette étude conformationnelle, nous avons réalisé la caractérisation physico-chimique des complexes de Mn^{2+} , afin d'établir une relation entre leurs structures et leur stabilité, inertie, et propriétés de relaxation. En particulier, l'un de nos objectifs était de mettre en évidence l'influence de la cavité bicyclique sur l'inertie de ces complexes.

1. Synthèse et étude conformationnelle des bispidines

1.1. Synthèse des bispidines

Toutes les synthèses ont été réalisées par l'équipe du Dr. Loïc Charbonnière et du Dr. Aline Nonat à l'IPHC à Strasbourg.

1.1.1. Bispidines dérivées de la lysine

Dans cette famille, mise à part la bispidine L^1 , nous avons étudié les complexes de Mn^{2+} des bispidines L^7 et L^8 qui diffèrent de L^1 , respectivement, par la réduction des carboxylates portés par les carbones C1 et C5 en alcool primaire (L^7), et par l'acylation de l'amine de la lysine pour obtenir une amide (L^8).

Leur schéma de synthèse est illustré sur la figure 3.4.

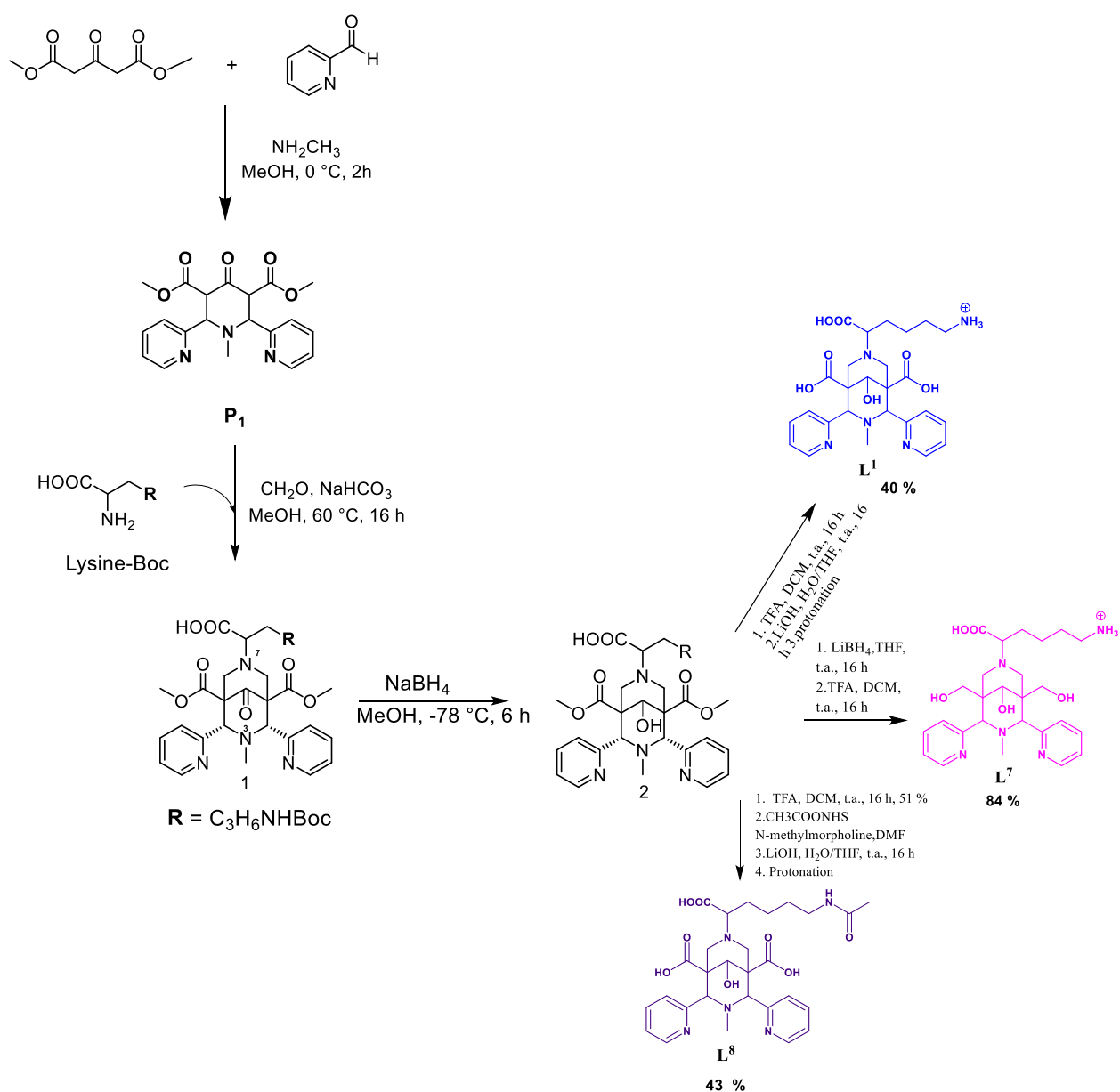


Figure 3.4 : Schéma de synthèse des bispidines considérées comme dérivées de la lysine.

Relation structure-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

1.1.2. Bispidines dérivées du phosphonate

La bispidine L^2 est obtenue en quatre étapes dans une synthèse convergente à partir de l'acide aminoéthyl-phosphonique et de la pipéridinone P_1 . L'acide aminoéthyl-phosphonique est préparé en deux étapes, par l'hydrogénolyse du composé N,N-dibenzylamine éthylphosphonate de diéthyle, suivie de l'hydrolyse acide de l'aminoéthylphosphonate de diéthyle (figure 3.5).

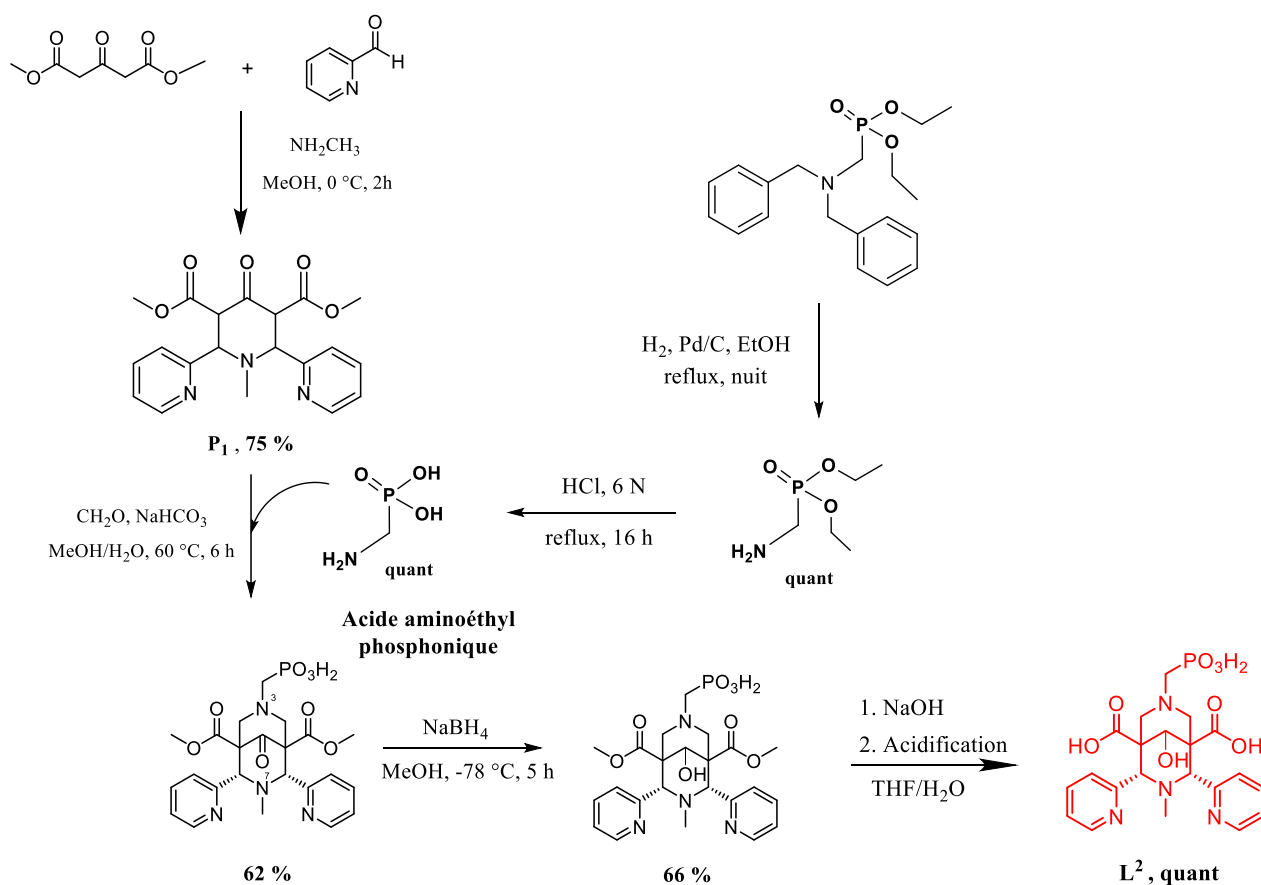


Figure 3.5 : Schéma de synthèse de L^2 , considérée comme dérivée du phosphonate.

Chapitre 3

1.1.3. Bispidines dérivées de la glycine

Dans cette famille, les bispidines L^3 et L^4 sont des isomères de position, portant respectivement un acétate sur l'azote N7 ou N3. Pour obtenir les bispidines fonctionnalisées en position N7, la pipéridinone de type P_1 est utilisée (figure 3.6).

Le composé 2, précurseur des bispidines L^3 , L^4 , L^5 et L^6 , est obtenu en trois étapes. Pour les bispidines L^3 et L^6 , fonctionnalisées en position N7 à partir du composé 2, une réaction de déprotection de l'amine est réalisée, suivie d'une substitution nucléophile sur le bromoacétate d'éthyle pour obtenir le précurseur de L^3 sous la forme estérifiée, ou sur le 2-bromoisobutyrate de méthyle pour obtenir celle de L^6 (figure 3.6). Enfin, L^3 et L^6 sont obtenus par hydrolyse des esters.

Pour L^4 et L^5 , fonctionnalisées en position N3, la même stratégie de synthèse a été adoptée, mais à partir de la pipéridinone P_2 .

Relation structure-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

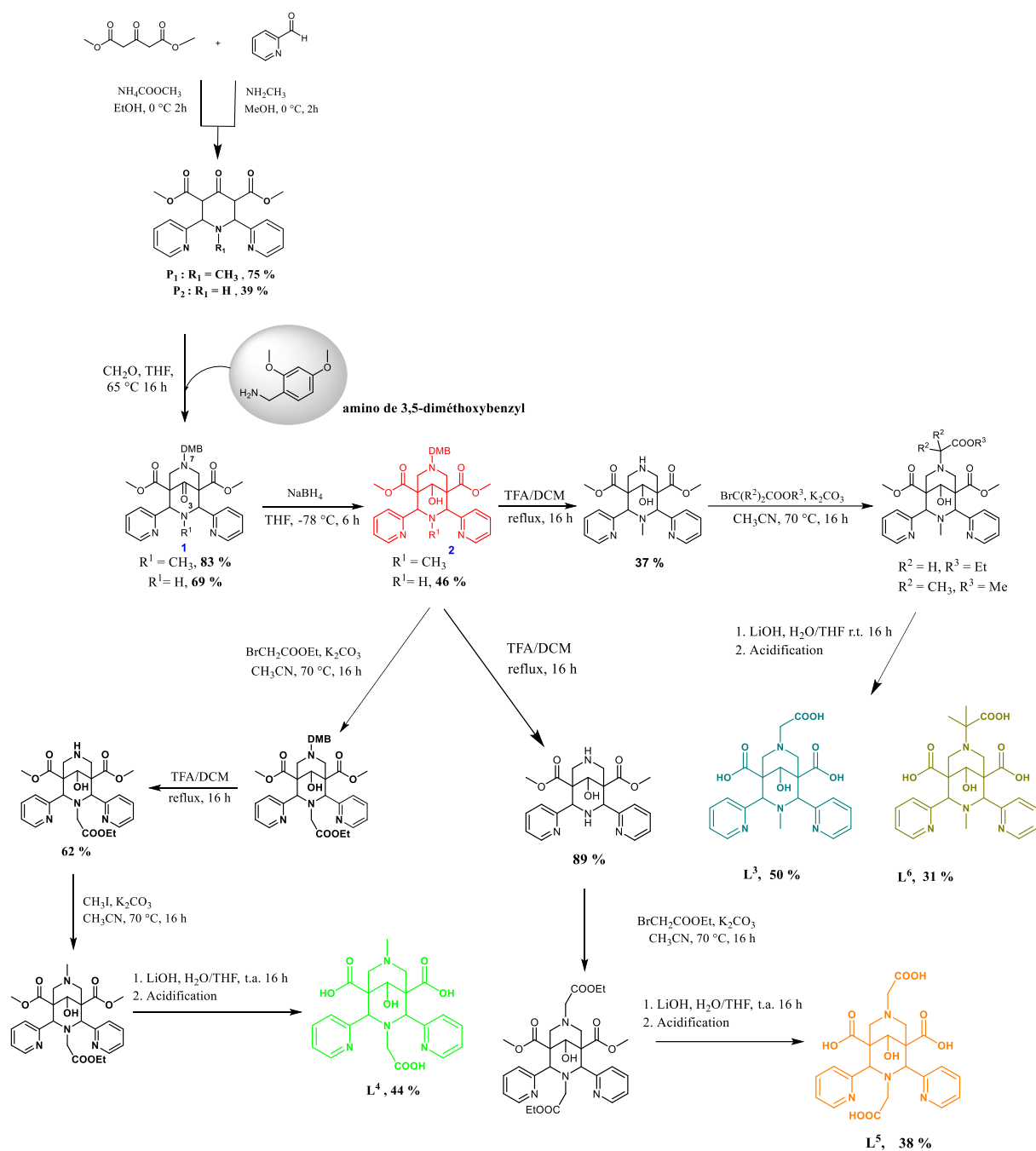


Figure 3.6 : Schéma de synthèse des bispidines considérées comme dérivées de la glycine.

1.2. Etude conformationnelle des ligands

1.2.1. Par pH-potentiométrie

Des études précédemment réalisées sur les bispidines ont montré que le degré de protonation des hétéroatomes du bicyclic (seul N3 ou N7 protoné, ou les deux) est intrinsèquement lié à la

Chapitre 3

conformation. Alors que la conformation chaise-chaise est toujours associée à la monoprotation, la diprotation est observée dans les conformations bateau-chaise ou bateau-bateau.⁶⁻⁷

Par conséquent, dans un premier temps nous avons réalisé des titrages pH-potentiométriques des bispidines L^2 , L^3 , L^4 , L^5 et L^6 entre pH 2 et 12 afin de déterminer leurs constantes de protonation et en particulier le degré de protonation des azotes du bicyclic.

La figure 3.7 représente les courbes de titrage pH-potentiométriques et le tableau 3.1 rassemble les constantes de protonation calculées.

Tout au long de ce chapitre, les résultats sur la bispidine L^1 , présentés dans le chapitre 2, seront également cités pour inclure la L^1 aussi dans les comparaisons.

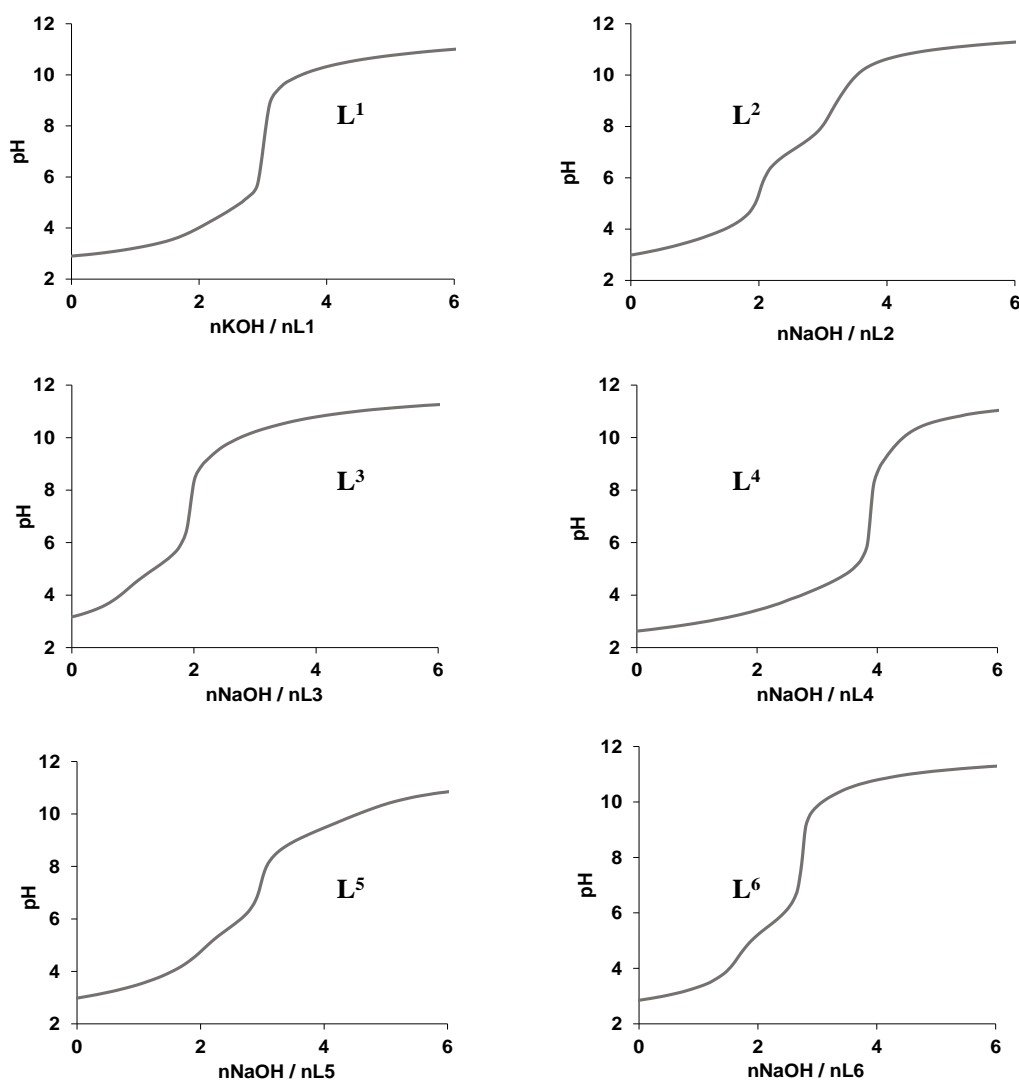


Figure 3.7 : Courbes de titrage potentiométrique des bispidines étudiées. $c_L = 1,6 \text{ mM}$. $I = 0,15 \text{ M NaCl}$; 25°C .

Relation structure-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

Tableau 3.1: Constantes de protonation des bispidines étudiées.

	L ¹	L ²	L ³	L ⁴	L ⁵	L ⁶
logK_{H1}	11,44(1)	11,15(1)	9,54(4)	11,37(2)	9,91(1)	10,74(1)
logK_{H2}	10,31(2)	7,35(3)	5,11(6)	10,46(2)	9,05(1)	5,55(1)
logK_{H3}	4,71(5)	3,78(4)	2,99(6)	4,65(3)	5,66(2)	2,89(1)
logK_{H4}	2,76(5)	3,02(5)	1,80(5)	3,40(3)	3,73(2)	1,48(1)
logK_{H5}	2,22(4)	-	-	2,89(3)	2,74(1)	-
logK_{H6}	-	-	-	-	1,40(2)	-
ΣlogK_{Hi}	31,44	25,26	19,44	32,93	32,49	20,66

En inspectant les constantes dans la gamme basique où la protonation des amines du bicyclic est attendue, une seule constante de protonation est obtenue pour tous les ligands, sauf pour L¹, L⁴ et L⁵, qui en ont deux. Pour L¹, nous avons vu dans le chapitre 2 que l'une de ces deux constantes de protonation (la deuxième) correspond à celle de l'amine de la lysine. Les ligands L⁴ et L⁵ ne possèdent pas d'autres sites que les amines tertiaires (N3 et N7) du bicyclic qui peuvent se protoner en milieu basique. Pour L⁴ et L⁵, le bicyclic peut être donc diprotoné (N3-H H-N7), alors que pour L¹, L², L³ et L⁶, il est monoproté (N³-H---N⁷ ; avec un pont hydrogène établi entre les deux sites). Ceci nous permet de conclure que la diprotonation est observée uniquement pour les ligands qui portent un groupement acétate en position N3.

La diprotonation du bicyclic entraîne vraisemblablement des répulsions électrostatiques entre les azotes N3 et N7 positivement chargés, ce qui pourrait en conséquence favoriser la formation des conformères bateau-chaise, bateau-bateau, ou le mélange des deux.

En plus, la conformation bateau-chaise peut être stabilisée par des liaisons hydrogène intramoléculaires entre le proton de l'azote N3 et les sites accepteurs d'hydrogène environnants, plus particulièrement l'oxygène du carboxylate porté par ce même azote, à travers la formation d'un pseudo-cycle à cinq chaînons (figure 3.8). D'ailleurs, une étude a été réalisée par l'équipe du Dr. Loïc Charbonnière sur les analogues bispidine de ces deux ligands, portant des

Chapitre 3

carboxylates estérifiés. Elle a également révélé une conformation bateau-chaise du bicyclic où les pyridines se trouvent en position *trans*.⁵

La comparaison des $\log K_{H1}$ de L^4 et L^5 nous a permis d'attribuer la première étape de protonation à l'azote N7. Pour L^4 , la basicité est renforcée par l'effet inductif donneur (+I) du méthyle. En revanche, elle est atténuée pour L^5 par la présence du carboxylate qui exerce un effet inductif attracteur (-I).

L'ensemble de ces résultats combinés à ceux de la littérature⁵⁻⁷ laisse prévoir une conformation bateau-chaise pour les molécules L^4 et L^5 , fonctionnalisées par un acétate en position N3, et chaise-chaise pour tous les autres dont le même azote porte un méthyle. Dans la suite, on se réfèrera respectivement aux systèmes diprotonés ($N^3\text{-H H-N}^7$ pour L^4 et L^5) ou monoprotoneés ($N^3\text{-H---N}^7$ pour L^1, L^2, L^3, L^6, L^7 et L^8). Dans le but de conforter cette hypothèse, nous avons réalisé une étude RMN 1 et 2D, plus particulièrement ROESY (Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy).

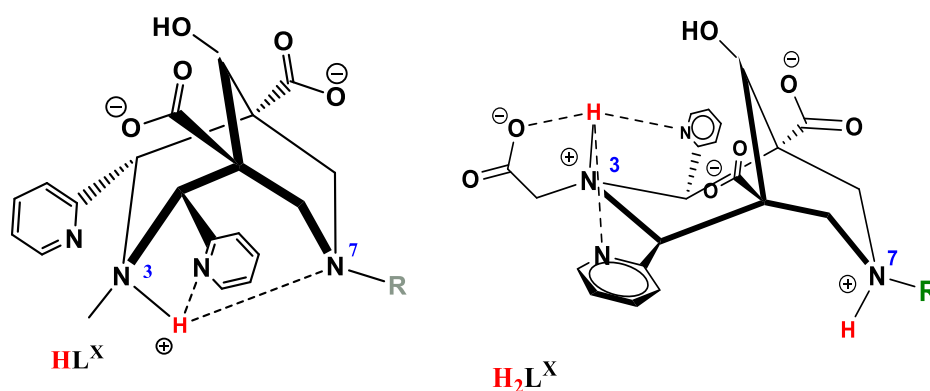


Figure 3.8 : Illustration des deux conformations supposées ; avec $X = 1, 2, 3$ et 6 pour HL^X ; $X = 4$ et 5 pour H_2L^X .

1.2.2. Par étude RMN

La structure 3D de ces bispidines en solution aqueuse est caractérisée à travers l'observation des couplages dipolaires des protons (effet NOE, Nuclear Overhauser Effect) ; nous avons choisi l'expérience ROESY, car elle est plus adaptée aux petites molécules et l'intensité de NOE est toujours positive.⁸

Relation structure-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

a) RMN 1D : ^1H

Nous classons les protons des bispidines dans trois groupes : les protons aromatiques, les protons du noyau bicyclique et les protons aliphatiques (figure 3.9).

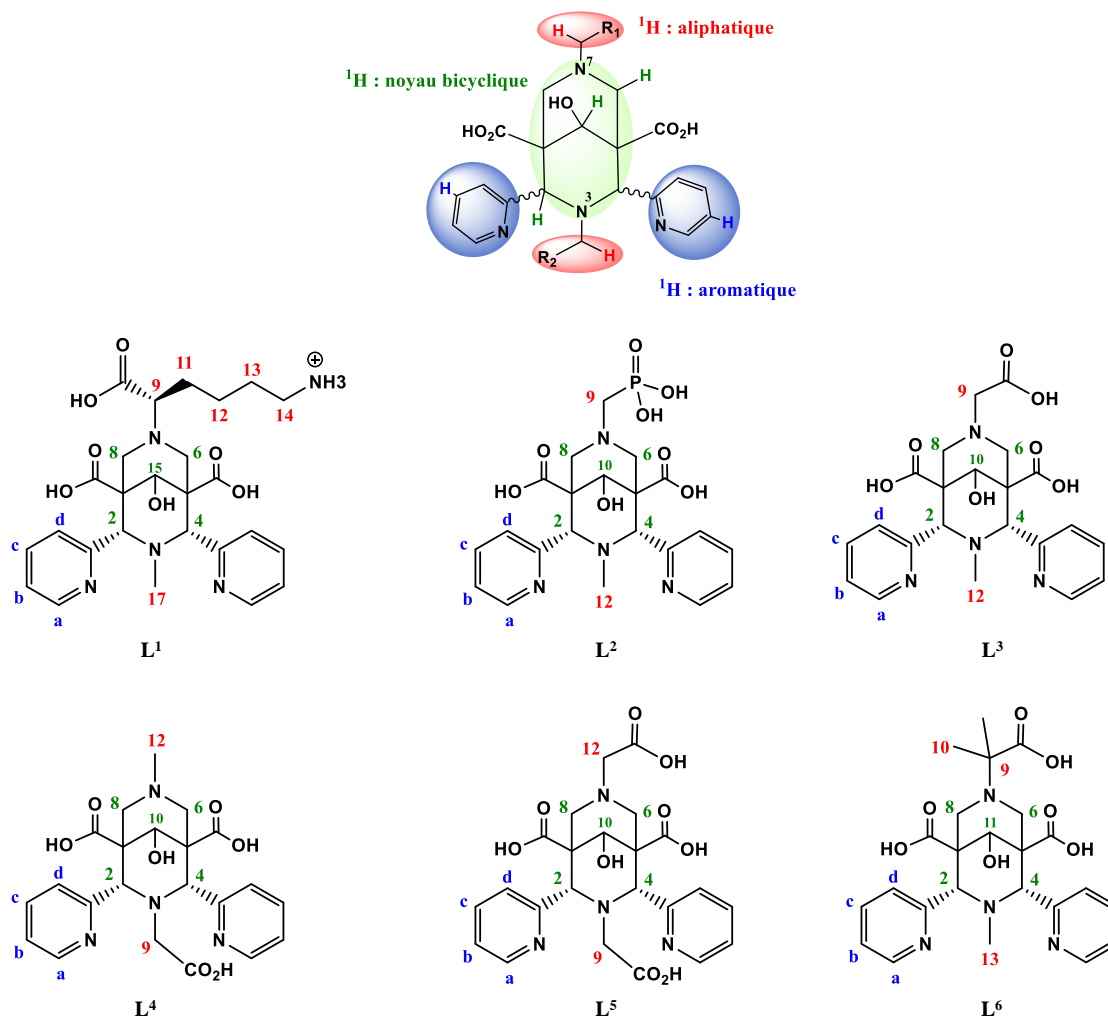


Figure 3.9 : Illustration des trois groupes de protons et représentation des ligands étudiés.

➤ Les protons aromatiques :

Leurs signaux portent des informations sur la symétrie ou l'asymétrie de la molécule. Le dédoublement de ces protons reflète la non-équivalence des deux pyridines, due à des liaisons hydrogène intramoléculaires entre certains protons des pyridines et les sites accepteurs d'hydrogène environnants.

Chapitre 3

➤ Les protons du noyau bicyclique :

Comme les protons aromatiques, ils informent sur la symétrie de la molécule. Ils permettent aussi de caractériser la conformation du bicyclic par la détermination de la position relative des protons $H^{6/8}_{ax-eq}$ et $H^{2/4}$ à travers l'effet NOE. En plus, la constante de couplage 2J , qui se réfère au couplage scalaire des protons $H^{6/8}_{ax}$ et $H^{6/8}_{eq}$, dépend de l'angle du dièdre des noyaux couplés et permet ainsi d'évaluer la rigidité du cycle pipéridine qui porte l'azote N7.

L'ordre du couplage est défini par la valeur du paramètre $\Delta\nu/J$, avec :

$$\Delta\nu = \sqrt{D^2 - J^2} \quad \text{équation 3.1}$$

$$D = \nu_{B/X} - \nu_A \quad \text{équation 3.2}$$

ν_A : fréquence de résonance de la partie A du système AB ou AX ;

$\nu_{B/X}$: fréquence de résonance de la partie B/X du système AB ou AX ;

$J_{AB/AX}$: constante de couplage des protons.

- Si $\Delta\nu/J > 10$: le couplage est généralement considéré de 1^{er} ordre (faible), le cycle se rigidifie et le système est de type AX.
- Si $\Delta\nu/J < 10$: le couplage est de 2nd ordre (fort), le cycle tend à perdre sa rigidité et le système est de type AB (effet toit).
- Si $\Delta\nu/J = 0$: le couplage est de 2nd ordre (très fort), le cycle perd sa rigidité et les protons deviennent magnétiquement équivalents (système A_2).

➤ Les protons aliphatiques :

Ils donnent des informations structurales très intéressantes, comme en témoigne l'étude RMN réalisée avec le $Mn(HL^1)$ dans le chapitre 2.

Il est à noter que la différence de déplacement chimique entre les protons équatoriaux et axiaux est positive ($\Delta\delta = \delta_{eq} - \delta_{ax} > 0$) quand le cycle est en conformation chaise (effet anisotrope).⁹

Les spectres RMN 1H des ligands étudiés sont représentés sur la figure 3.10.

Relation structure-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

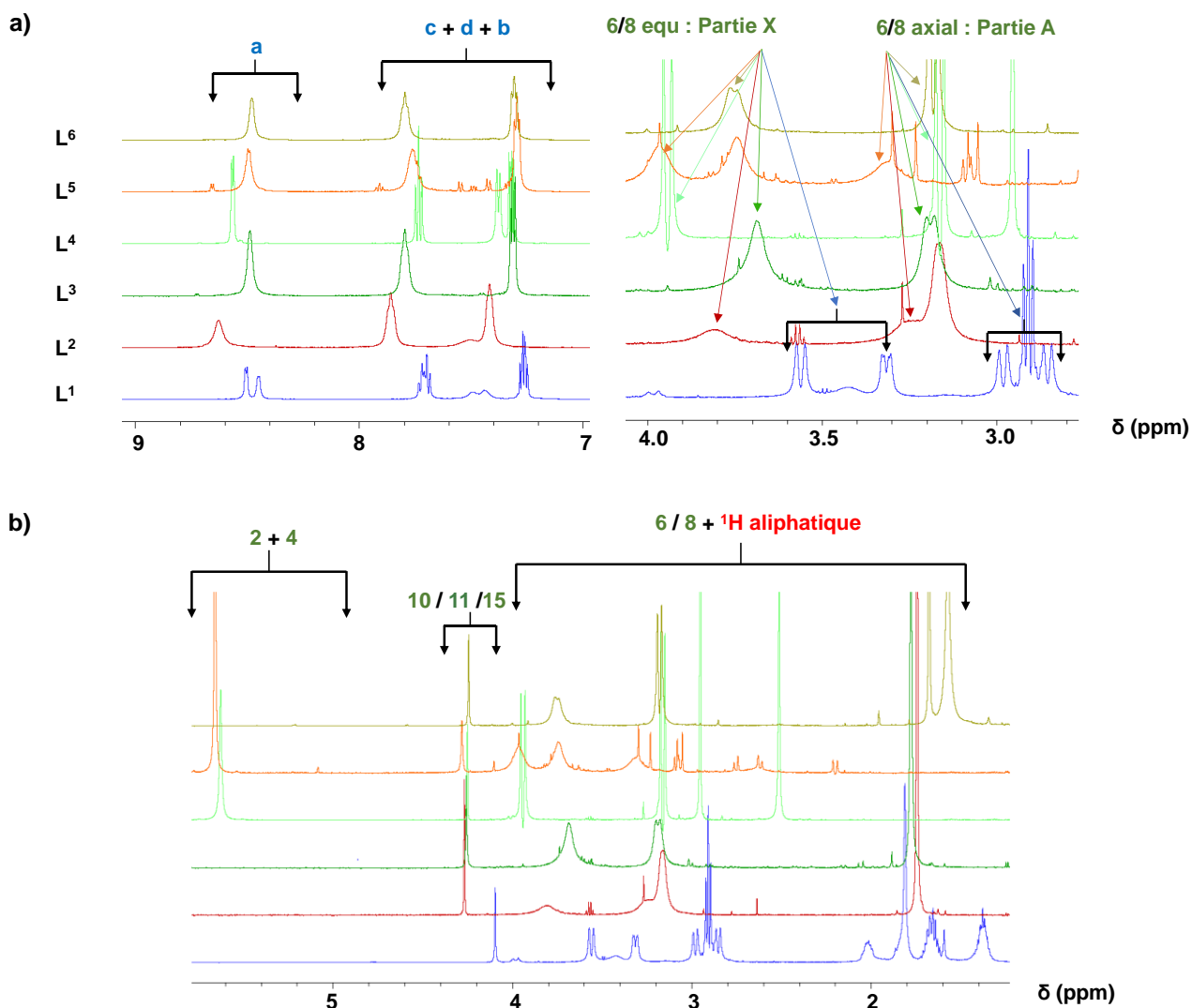


Figure 3.10 : Spectre RMN ^1H des bispidines étudiées ; pD 7,7 ; 600 MHz ; 25°C.

L'attribution des protons est basée sur l'analyse des spectres RMN 1D (^1H) et 2D (TOCSY et HSQC, voir partie expérimentale) et des données de la littérature.

Les spectres RMN ^1H révèlent une haute symétrie de ces bispidines, à l'exception de la L¹, qui possède un centre asymétrique au niveau du carbone C9. L'asymétrie de L¹ est caractérisée par le dédoublement de tous les protons des pyridines et des protons H^{6/8}ax-eq du cycle pipéridine(N7) (voir Chapitre 2).

L'analyse des déplacements chimiques des protons H^{6/8}ax-eq suggère une conformation chaise du cycle pipéridine(N7) pour tous les ligands.

Pour évaluer la rigidité du cycle, nous avons calculé le paramètre $\Delta\nu/J$ des protons H^{6/8}ax-eq de chaque ligand (tableau 3.2).

Chapitre 3

*Tableau 3.2: Paramètres RMN caractérisant la rigidité du cycle pipéridine(N7). * Valeur fixée, en prenant la valeur moyenne du $^2J_{AX}$ des autres bispidines.*

Ligand	ν_X (Hz)	ν_A (Hz)	D (Hz)	$^2J_{AX}$ (Hz)	$\Delta\nu$ (Hz)	$\Delta\nu/J$
L ¹	2136	1788	348	14,72	347,59	23,61
L ²	2285	1943	342	14,27*	342,11	23,97
L ³	2212	1914	297	13,41	297,14	22,17
L ⁴	2365	1897	468	14,60	467,71	40,01
L ⁵	2381	1985	396	14,27*	395,77	27,73
L ⁶	2251	1909	342	14,32	342,12	23,89

Les constantes de couplage scalaire élevées et les valeurs du $\Delta\nu/J$ qui dépassent 10 mettent en évidence la rigidité du cycle pipéridine(N7)⁵ et la présence d'un système de type AX. La valeur de $\Delta\nu/J$ est particulièrement élevée pour L⁴ et L⁵ (sous forme diprotonée N³-**HH**-N⁷ à pH 7,3), qui pourrait être la conséquence des interactions inter et/ou intramoléculaires entre les protons équatoriaux H^{6/8}eq et leur environnement le plus proche (figure 3.11). À noter que mis à part les protons échangeables des azotes N3/N7, les bispidines portent d'autres sites donneurs d'hydrogène (C-H^{py}, C-H^{2/4}, C-H^{6/8}), et la force des liaisons hydrogène du système (C-H---O) a été estimée entre 1,7 et 4,0 kJ.mol⁻¹.⁵

b) RMN 2D : ROESY

Nous avons analysé les spectres RMN ROESY des bispidines L^4 (système $N^3\text{-H H-N}^7$) et L^6 (système $N^3\text{-H---N}^7$) à pH 7 (pD 7,41). Le choix de ces deux bispidines découle tout simplement du fait que le signal des protons $H^{2/4}$ du cycle pipéridine(N^3) est facilement observable alors qu'il est sous le pic de l'eau pour les autres ligands (à l'exception du L^5 qui a un spectre similaire à celui du L^4 , mais moins résolu). Tous les spectres sont enregistrés dans les mêmes conditions expérimentales (pH, concentration, nombre de scans, etc).

Afin de caractériser la conformation du cycle pipéridine(N^3), nous avons plutôt suivi les tâches de corrélation entre protons $H^{2/4}$ et $H^{6/8ax/eq}$ (figure 3.12). En effet, en fonction de la conformation du bicyclic, la position relative des protons $H^{2/4}$ du cycle pipéridine(N^3) vis-à-vis des protons $H^{6/8}$ en position axiale et équatoriale diffère (figure 3.12) ; en conséquence leur couplage dipolaire sera affecté.

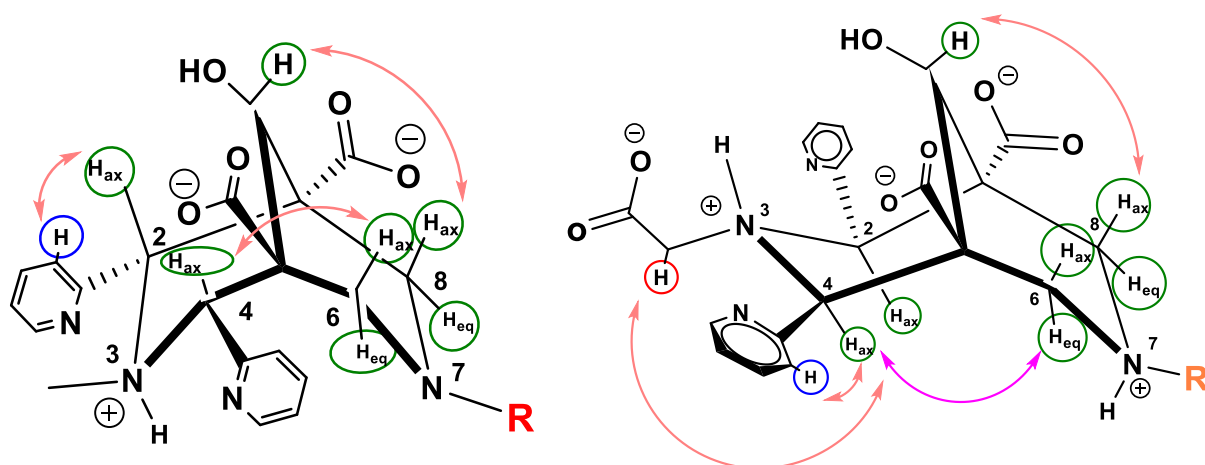


Figure 3.12 : Illustration des corrélations probables en fonction de la conformation du bicyclic : L^6 (à gauche) et L^4 (à droite).

Relation structure-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

➤ Etude du spectre ROESY de L^6 (système N^3 -H--- N^7)

La figure 3.13 représente la région du spectre ROESY où on observe les protons du noyau bicyclique et aliphatiques.

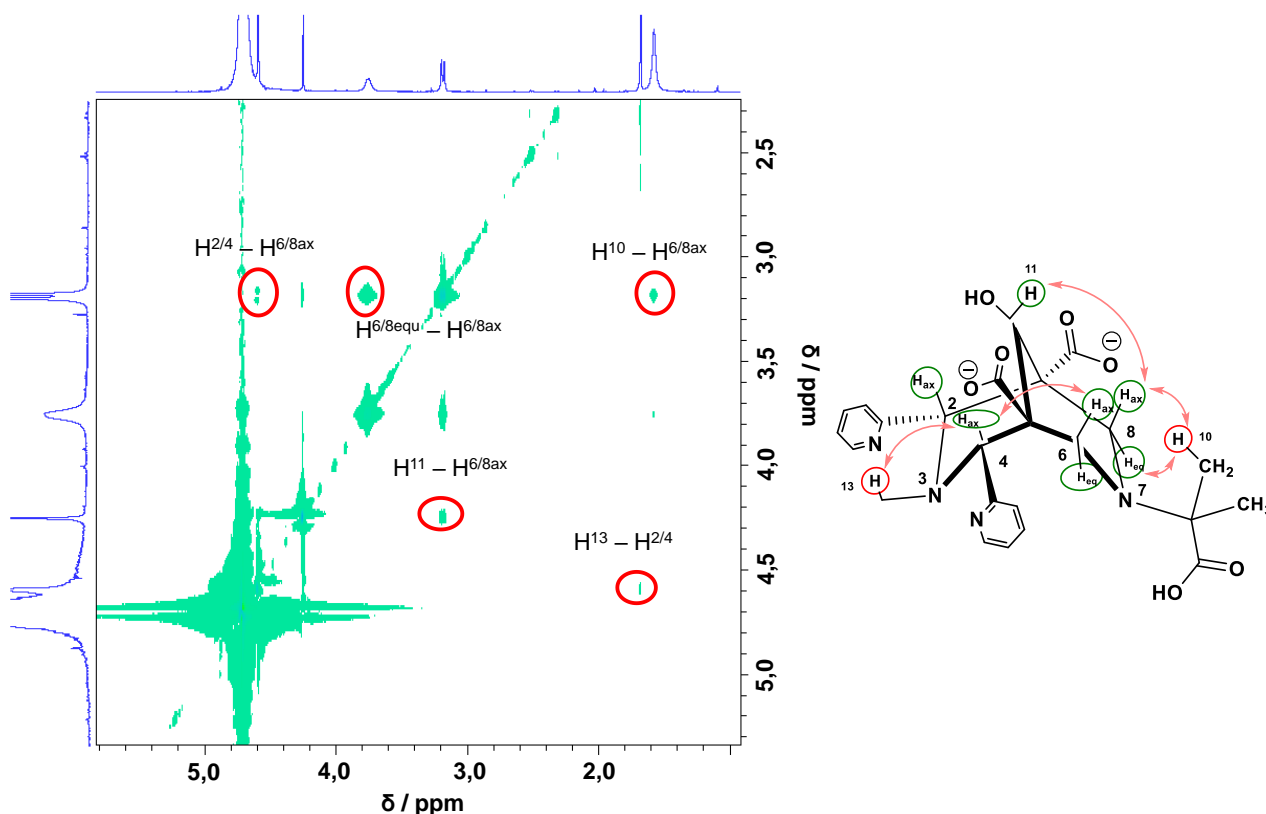


Figure 3.13 : Spectre ROESY de la bispidine L^6 et illustration des corrélations observées.

Le couplage dipolaire observé entre les protons $H^{6/8}$ axiaux et H^{11} confirme la conformation chaise du cycle pipéridine(N^7).

Entre les protons $H^{2/4}$ et $H^{6/8}$, seule la corrélation avec les $H^{6/8}$ en position axiale est observable, suggérant qu'ils sont plus proches des protons $H^{2/4}$ que leurs diastérotopes en position équatoriale ($H^{6/8eq}$). En conséquence, nous pouvons déduire que les protons $H^{2/4}$ sont en position axiale. Donc, ces résultats confirment la conformation chaise-chaise de la bispidine L^6 , avec les pyridines en position *cis* et la fonction alcool en tête de pont pointant vers l'azote N^3 .

Chapitre 3

➤ Etude du spectre ROESY de L⁴ (système N³-H H-N⁷)

La figure 3.14 représente la région du spectre ROESY où on observe les protons du noyau bispidol et aliphatiques. Pour le cycle pipéridine(N7), les mêmes corrélations sont détectées que dans le cas du L⁶, confirmant sa conformation de type chaise. En revanche, et contrairement à la bispidine L⁶, une tâche de corrélation apparaît également entre les protons H^{2/4} et H^{6/8}eq, avec un NOE deux fois plus intense que celui avec les H^{6/8} en position axiale, suggérant la proximité des protons H^{2/4} et H^{6/8} équatoriaux. En plus, quasiment les mêmes intensités d'effet NOE sont observées pour les corrélations H^{2/4}--H⁹ et H^{2/4}--H^{6/8}eq, confortant la structure proposée sur la figure 3.14.

Ces résultats suggèrent la conformation bateau du cycle pipéridine(N3) de la bispidine L⁴, avec les pyridines en position *cis*.

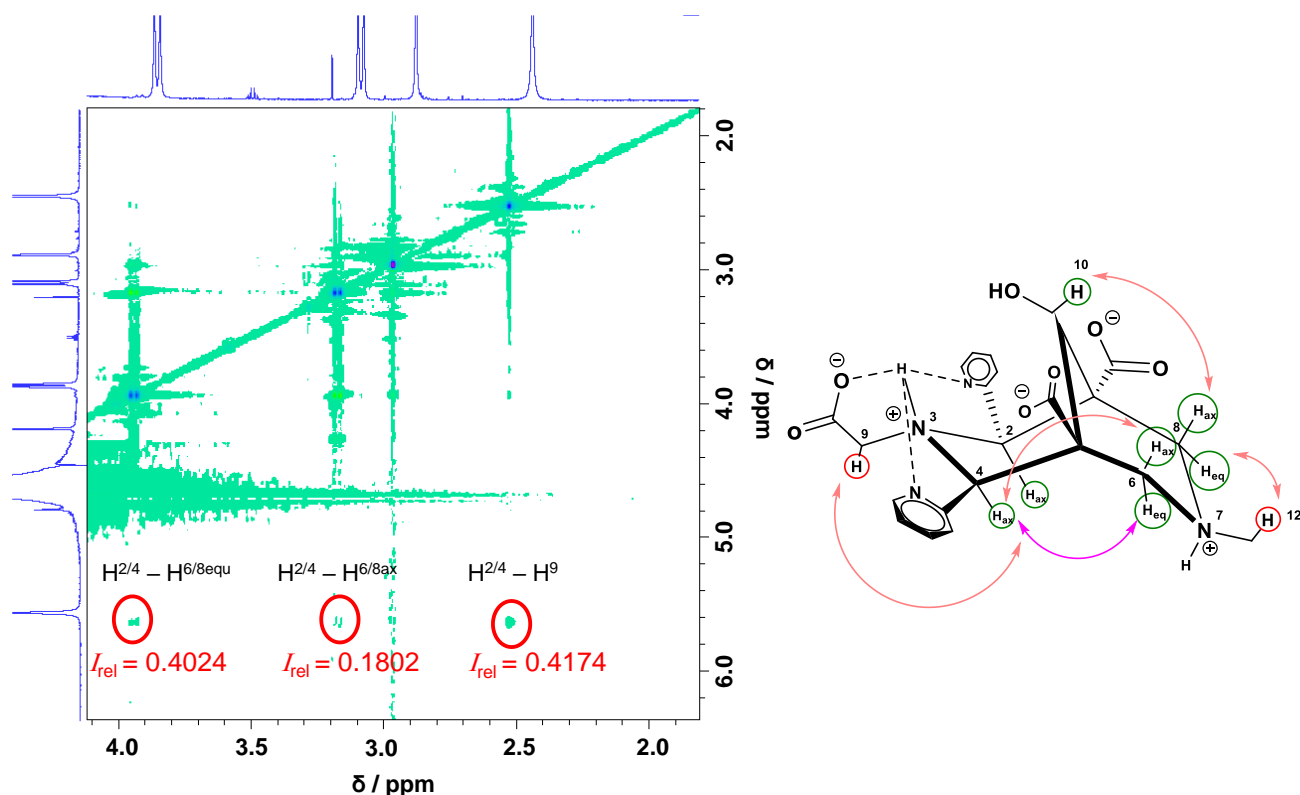


Figure 3.14 : Spectre ROESY de L⁴ et illustration des corrélations observées.

Relation structure-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

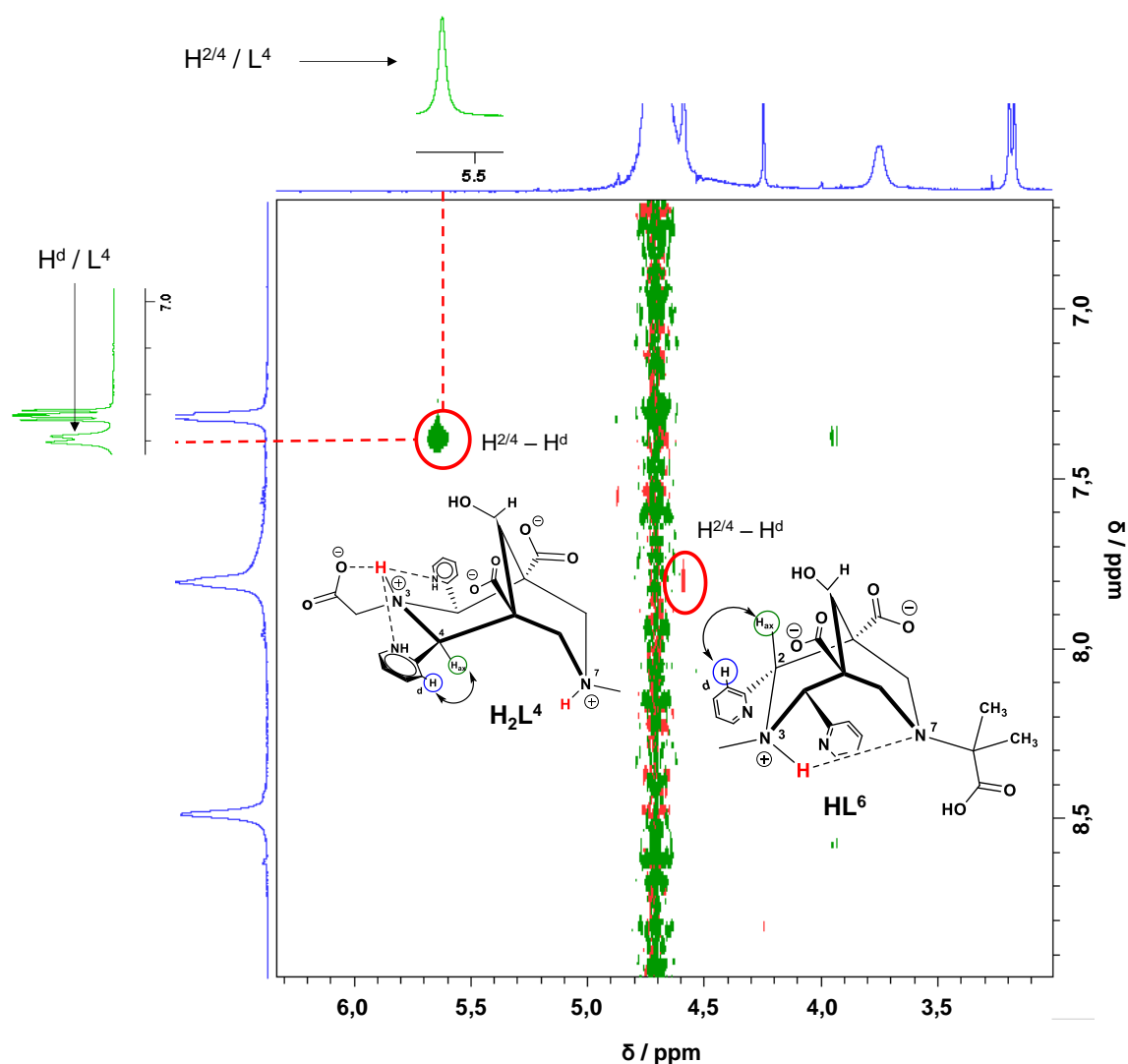


Figure 3.15 : Superposition des spectres ROESY de L^4 (couleur verte) et L^6 (couleur rouge) dans la région des protons aromatiques et du noyau bicyclique.

La figure 3.15 indique une tâche de corrélation très intense entre les protons H^d et $H^{2/4}$ pour L^4 , en contraste avec L^6 . Ceci est probablement la conséquence d'une modification de l'angle du dièdre, qui rapproche les deux groupes de protons dans la conformation bateau. En plus, les pyridines sont bloquées dans H_2L^4 (figure 3.15) et non dans HL^6 (libre rotation).

En résumé, ces résultats RMN sont en parfait accord avec les conclusions des titrages potentiométriques et indiquent que les bispidines dont le bicyclic reste monoprotoné (N^3-H-N^7) (L^1, L^2, L^3, L^6) adoptent une conformation chaise-chaise, avec une cavité bicyclique adaptée à la complexation de métaux. En contraste, les ligands dont le bicyclic subit une double protonation ($N^3-H-H-N^7$: L^4, L^5), auront une conformation bateau-chaise, dénuée de cavité bicyclique. La comparaison directe entre les isomères L^3 et L^4 montre à quel point le

Chapitre 3

changement de la position d'un groupe donneur peut influencer sur la conformation du bicycle, et ainsi sur les propriétés de coordination de ces ligands.

La suite du chapitre est consacrée à la compréhension des relations entre la structure et les caractéristiques physico-chimiques des complexes de Mn^{2+} formés par ces ligands. Nous allons nous intéresser aux stabilités, inerties, ainsi qu'aux propriétés de relaxation et mettre en évidence l'influence déterminante de la « cavité bicyclique ».

2. Etude de la relation structures-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

Dans le processus de validation d'un complexe métallique paramagnétique comme agent de contraste en IRM, l'étude des propriétés physico-chimiques est primordiale afin d'évaluer leur stabilité, leur inertie cinétique et leur efficacité. Or, ces propriétés sont intimement liées à la structure du ligand. Notre objectif a été alors de mieux comprendre la corrélation entre les structures des complexes bispidines et leurs propriétés physico-chimiques.

2.1. Etude de la complexation des ligands de type bispidine avec le Mn^{2+} à pH physiologique et de la stabilité des complexes

2.1.1. Etude de la complexation à pH physiologique

Cette étape est essentielle pour définir le protocole expérimental approprié pour la préparation des complexes de Mn^{2+} utilisés lors des études *ex* et *in vivo* ainsi que pour la détermination des constantes de stabilité par titrage potentiométrique. À cet égard, nous avons suivi trois grandeurs physiques liées aux propriétés physico-chimiques des réactifs mis en jeu, tels que le temps de relaxation longitudinale, l'absorbance UV-vis et le pH, suite à un mélange équimolaire du Mn^{2+} et du ligand correspondant dans une solution aqueuse.

Relation structure-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

a) Suivi de la complexation par relaxométrie

L'évolution du temps de relaxation longitudinal en fonction du temps dans des solutions tamponnées à pH 7,4 (figure 3.16), qui reflète dans notre cas l'évolution de la première sphère de coordination du Mn^{2+} , révèle trois scénarios différents en fonction du ligand :

- a) Complexation très rapide avec L^4 et L^5 ;
- b) Complexation relativement lente avec L^2 et L^3 ;
- c) Complexation lente avec L^1 , L^6 , L^7 et L^8 .

Chapitre 3

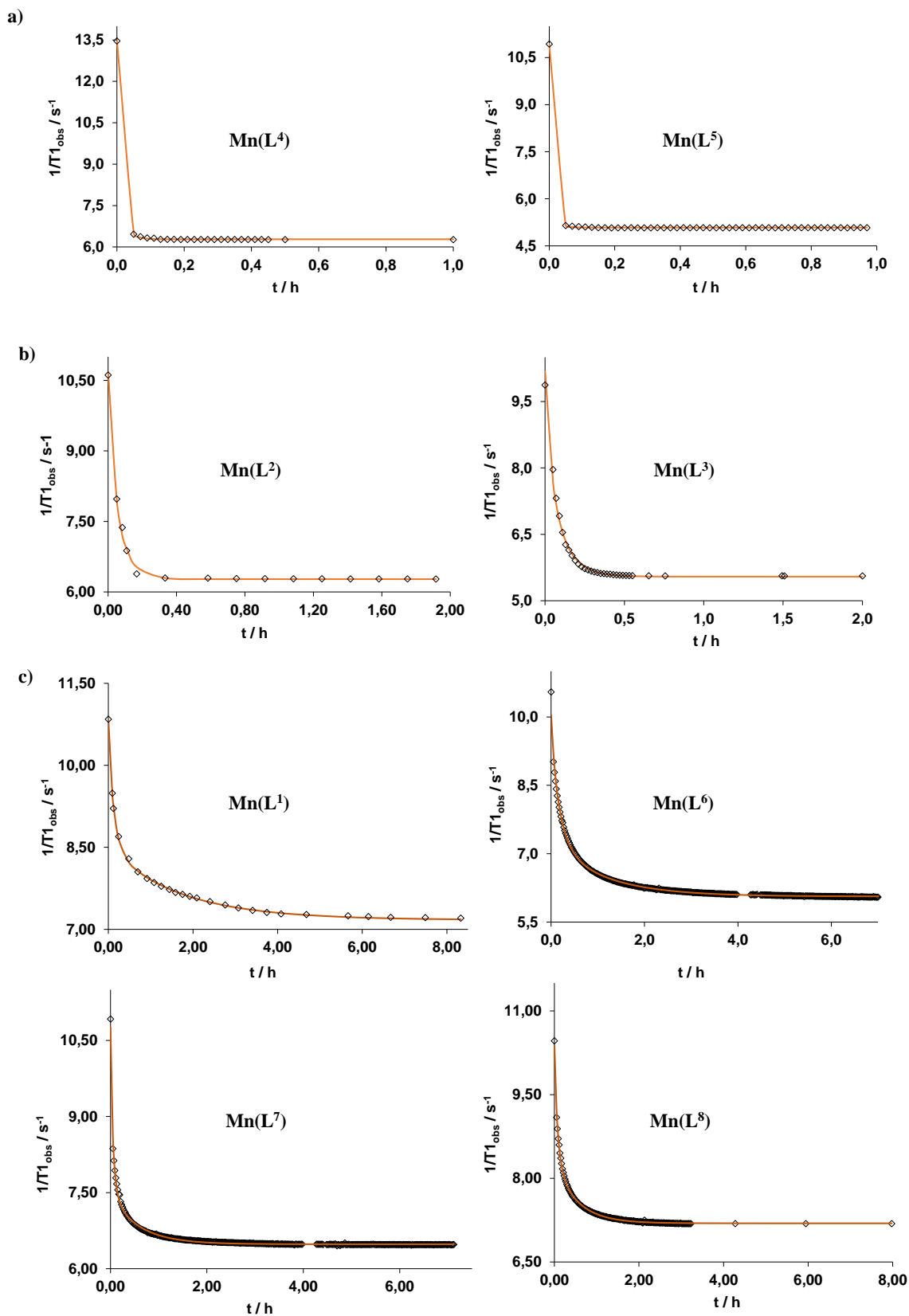


Figure 3.16 : Evolution de la vitesse de relaxation longitudinale en fonction du temps à pH 7,4 dans une solution équimolaire de Mn^{2+} et L en milieu aqueux. $c_L = c_{Mn^{2+}} = 1,5$ mM ; $C_{HEPES} = 50$ mM ; 60 MHz ; 25°C.

Relation structure-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

La complexation se fait en quelques minutes avec L^4 et L^5 , qui sont diprotonés à pH 7 ($N^3\text{-H}^+\text{-N}^7$); sans différence notable entre les deux ligands.

Tous les autres ligands sont monoprotés sur le bicyclic à pH 7 ($N^3\text{-H}\text{-N}^7$). La différence principale entre les groupes (b) (L^2, L^3) et (c) (L^1, L^6, L^7 et L^8) est que, contrairement aux ligands du groupe (b), les molécules L^1, L^6, L^7 et L^8 possèdent un groupement encombrant en position α du groupement fonctionnel (carboxylate) porté par l'azote N^7 (figure 3.17). L'encombrement stérique induit par la présence de ce groupement est responsable du ralentissement de la cinétique de formation. Ce phénomène est connu dans la famille des complexes de lanthanides formés par des dérivés DOTA, où par exemple l'introduction des groupements méthyle en position α sur les bras acétates du DOTA (ligand DOTMA) conduit à une diminution de la vitesse de formation du complexe d' Eu^{3+} de 3 ordres de grandeur.¹⁴

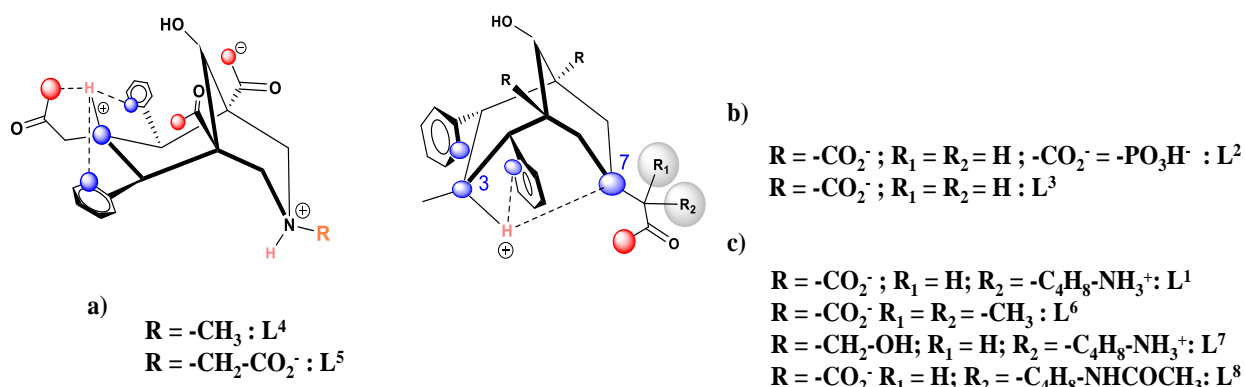


Figure 3.17 : Classification des ligands selon la cinétique de formation des complexes de Mn^{2+} : a) formation rapide ; b) relativement lente et c) lente.

Notre objectif n'était pas de réaliser une étude poussée de la cinétique de formation des complexes Mn(L) avec des ligands de type bispidine ; néanmoins, nous avons voulu faire une estimation des temps de demi-vie de la réaction dans nos conditions expérimentales (qui ne sont pas des conditions de pseudo-premier ordre). Nous avons donc fait un ajustement des données de la figure 3.16 (sauf pour $\text{Mn(L}^4)$ et $\text{Mn(L}^5)$ qui ont une cinétique trop rapide) à une fonction mono-exponentielle. Il est intéressant d'observer que seules les courbes de $\text{Mn(L}^2)$ et $\text{Mn(L}^3)$ (groupe b) peuvent être calculées avec une fonction mono-exponentielle. Les k_{obs} et $t_{1/2}$ obtenus sont respectivement $3,91 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ et 1,41 min pour $\text{Mn(L}^2)$ et $2,74 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ et 2,17 min pour $\text{Mn(L}^3)$. Pour tous les autres complexes (groupe c), la variation du $1/T_1$ avec le temps peut être décrite par une fonction bi-exponentielle. Même si l'interprétation de cette observation

Chapitre 3

n'est pas évidente, cela montre encore une fois que la cinétique de formation de ces deux groupes de complexes est très différente.

b) Suivi de la complexation par spectroscopie UV-visible

La complexation du Mn^{2+} par les ligands de type bispidine L^1 , L^4 , L^5 et L^6 a été également suivie par spectroscopie UV-visible *via* l'évolution de la bande d'absorption due aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ des pyridines en fonction du temps (figure 3.18).

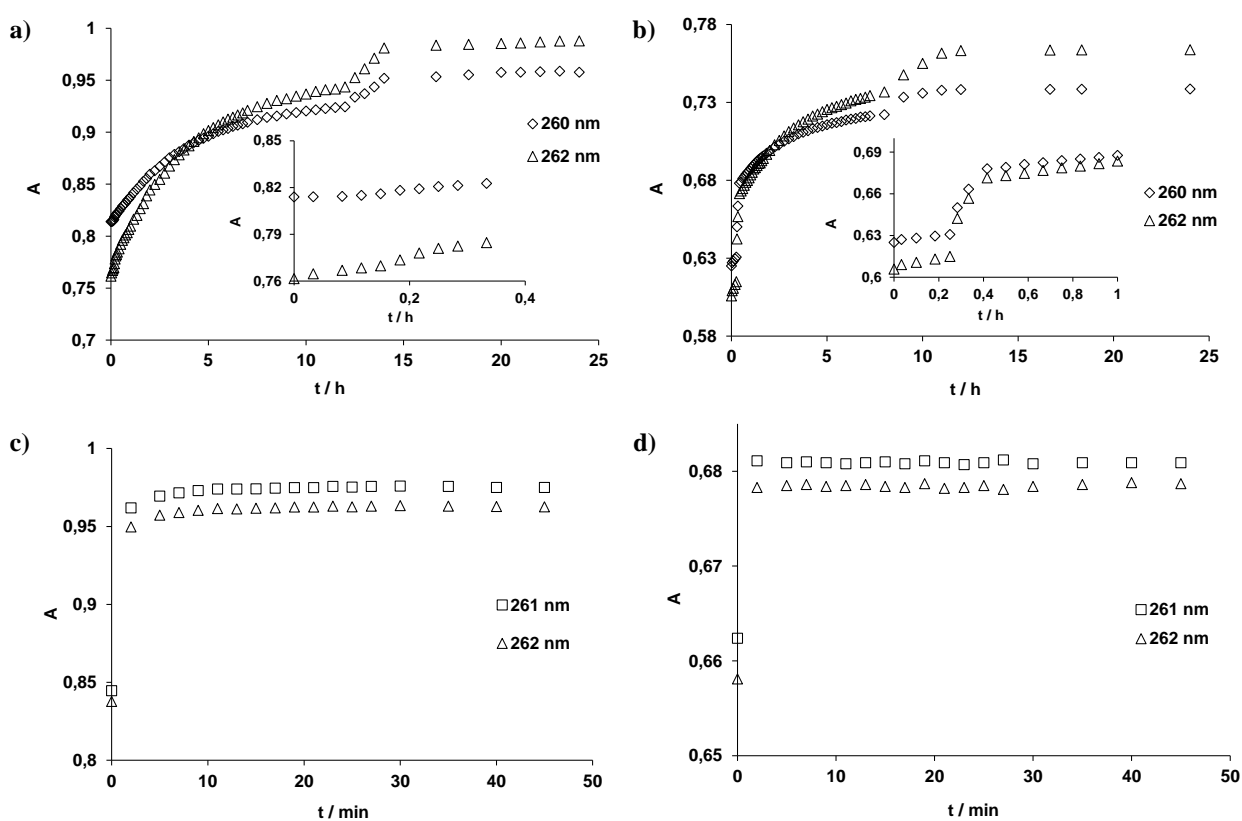


Figure 3.18 : Evolution de l'absorbance en fonction du temps : a) $Mn(L^1)$; b) $Mn(L^6)$; c) $Mn(L^4)$; d) $Mn(L^5)$; pH 7,36 ; à 25°C ; $c_{Mn^{2+}} = c_L = 45 \mu M$, $c_{HEPES} = 2 mM$. Pour plus de clarté, nous avons inséré dans les graphes a et b, la région qui illustre les premières minutes de la complexation.

Pour L^1 et L^6 dont la réaction est lente, nous avons suivi les longueurs d'onde de l'absorbance maximale (λ_{max}) du ligand (260 nm) et du complexe (262 nm). Entre les ligands et leurs complexes, nous observons une évolution hyperchrome, accompagnée d'un effet bathochrome. Dans les premières minutes ($< 0,2 h$) après avoir mélangé le Mn^{2+} avec le ligand, aucune évolution de l'absorbance n'est observée, avant une augmentation lente et l'arrivée à un plateau

Relation structure-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

au bout de 12 et 15 h respectivement pour Mn(L⁶) et Mn(L¹). Une deuxième phase d'augmentation est observée par la suite (figures 3.18 et 3.19).

Ces résultats permettent de conclure l'implication progressive des pyridines dans la complexation du Mn²⁺. Il semble que la coordination des pyridines n'est pas immédiate, ce qui suggère la formation d'un pré-complexe dans lequel l'azote des pyridines ne sont pas (entièrement) coordonnés.

Comme vu précédemment dans le suivi par relaxométrie, avec les ligands L⁴ et L⁵, la formation du complexe est très rapide, et elle est accompagnée d'une évolution hyperchrome, sans changement dans la position de la bande d'absorption (figure 3.18).

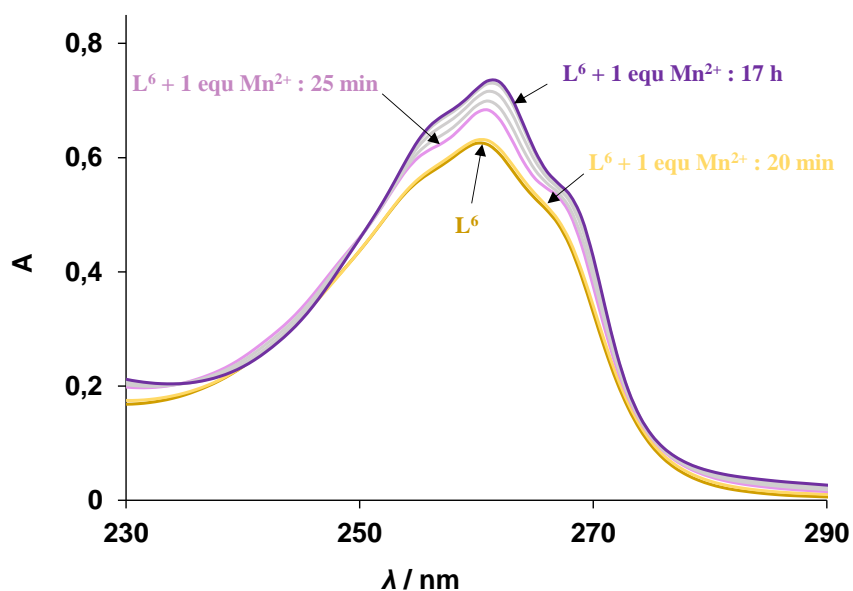


Figure 3.19 : Spectres UV-vis pendant l'évolution de la complexation de la bispidine L⁶. $c_{L6} = c_{Mn^{2+}} = 45 \mu M$, $pH 7$, $c_{HEPES} = 2 mM$, $25 ^\circ C$. $I = 0.1 M$.

c) Suivi de la complexation par potentiométrie

Les résultats précédents (pour L¹ et L⁶) semblent indiquer la formation d'un pré-complexe dans un premier temps. Des intermédiaires diprotonés ont été décrits dans la formation des complexes de lanthanides avec des ligands cyclènes (comme le DOTA), dont la déprotonation constitue l'étape déterminante de la cinétique.¹⁵⁻¹⁹ Il est tout à fait plausible d'imaginer la formation d'un complexe monoproté comme intermédiaire dans notre cas, étant donné la monoprotation du ligand à pH 7,4.

Chapitre 3

Afin d'obtenir des informations sur le degré de protonation de ce pré-complexe, nous avons suivi un protocole similaire à ce qui était précédemment utilisé dans l'étude de cinétique de formation du Gd(DOTA).²⁰ Après avoir mélangé le Mn^{2+} et la bispidine L^6 en proportion équimolaire (3 mM) à pH 7,36 dans une solution faiblement tamponnée (25 mM HEPES), nous avons suivi l'évolution du pH en fonction du temps (figure 3.20-a). Dans les premières minutes de la complexation, le pH est quasi-constant, puis diminue progressivement jusqu'à l'état d'équilibre, atteint au bout de 2 h. Cette temporalité est en accord avec celle obtenue par relaxométrie (figure 3.16), et l'évolution du pH suggère que l'étape déterminante de la cinétique de formation correspond bien à la déprotonation de l'intermédiaire $Mn(HL^6)^*$.

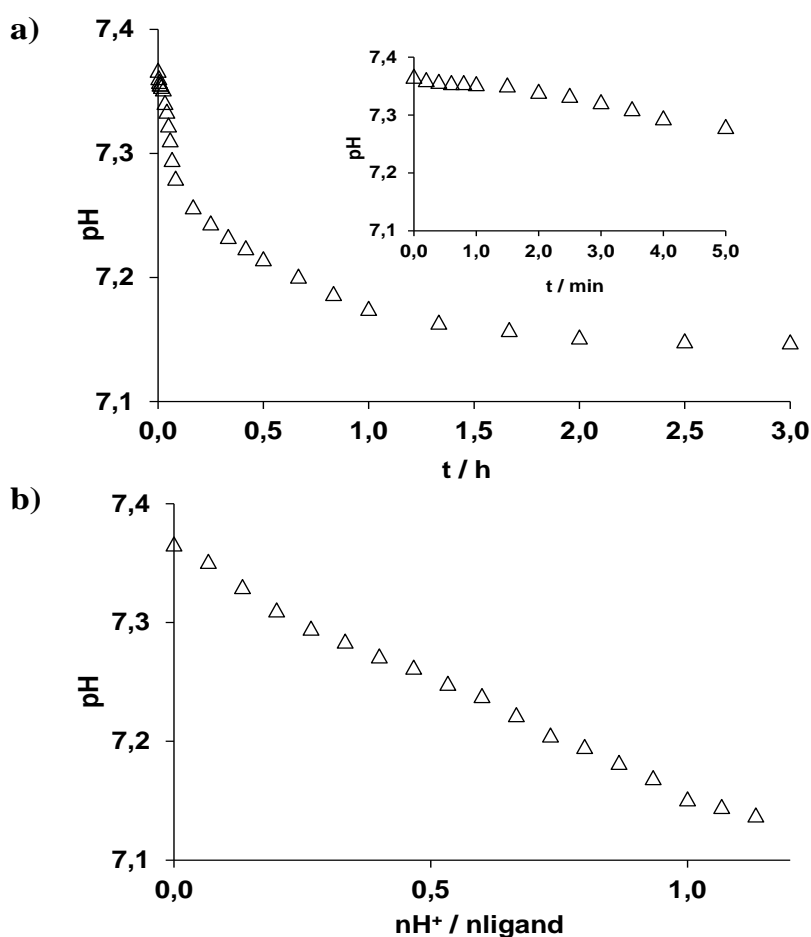


Figure 3.20 : a) Evolution du pH en fonction du temps. $c_{L6} = c_{Mn^{2+}} = 3 \text{ mM}$; $c_{HEPES} = 25 \text{ mM}$; b) Titrage potentiométrique de l'HEPES avec du HCl. $c_{HCl} = 0,1 \text{ M}$. $I = 0,15 \text{ M NaCl}$.

Pour mettre en évidence la quantité exacte de protons mise en jeu, nous avons titré une solution contenant la même concentration d'HEPES que celle utilisée dans l'expérience précédente avec

Relation structure-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

de l'acide chlorhydrique (0,1 M) jusqu'à atteindre le pH mesuré à l'équilibre de la complexation (figure 3.20-b). Cette courbe de titrage révèle qu'avec l'ajout d'un équivalent de protons (par ligand), on obtient la même variation de pH que celle observée lors de la réaction de complexation de L^6 . Ceci nous permet de conclure que le pré-complexe formé dans la première étape de la formation de $Mn(L^6)$ est un intermédiaire monoprotoné.

La même expérience a été répétée avec la bispidine L^1 et conduit au même résultat. On note néanmoins que pour L^1 , le complexe final formé à pH 7,4 est un complexe monoprotoné (sur la lysine ; $Mn(HL^1)$), donc l'intermédiaire est en réalité un complexe diprotoné.

2.1.2. Stabilité

Afin d'évaluer la stabilité des complexes de Mn^{2+} et de Zn^{2+} formés avec les ligands, des études potentiométriques ont été réalisés entre pH 2 et 12.

Pour les complexes de Mn^{2+} des bispidines L^3 et L^6 qui se forment lentement, nous avons réalisé des batchs entre pH 2,5 et 7. Pour L^2 , la complexation du Mn^{2+} est complète au delà de 10 min à pH 7 (et en 15 min à pH 3), nous avons donc réalisé un titrage manuel dans cette gamme de pH avec un temps approprié pour atteindre l'équilibre (~20 min). En revanche, pour L^4 et L^5 la complexation est rapide même en milieu acide, nous avons alors réalisé un titrage automatique ; de même que pour tous les complexes de Zn^{2+} qui se forment rapidement.

La figure 3.21 représente les courbes de titrage. Les données expérimentales ont été analysées *via* le logiciel Hyperquad 2008 et le tableau 3.3 représente les constantes de stabilité et de protonation des complexes (voir l'équation 2.2 pour la définition des constantes). Les valeurs de pMn et pZn ont été également calculées ; elles permettent une comparaison des stabilités indépendamment de la basicité des ligands. La figure 3.22 représente la distribution des espèces pour les complexes de Mn^{2+} calculée selon les constantes déterminées, ainsi que l'évolution de leur relaxivité en fonction du pH. L'évolution de la relaxivité de ces systèmes en fonction du pH est en parfait accord avec la distribution des espèces, confirmant le model d'équilibre utilisé pour la détermination des constantes de stabilité.

Chapitre 3

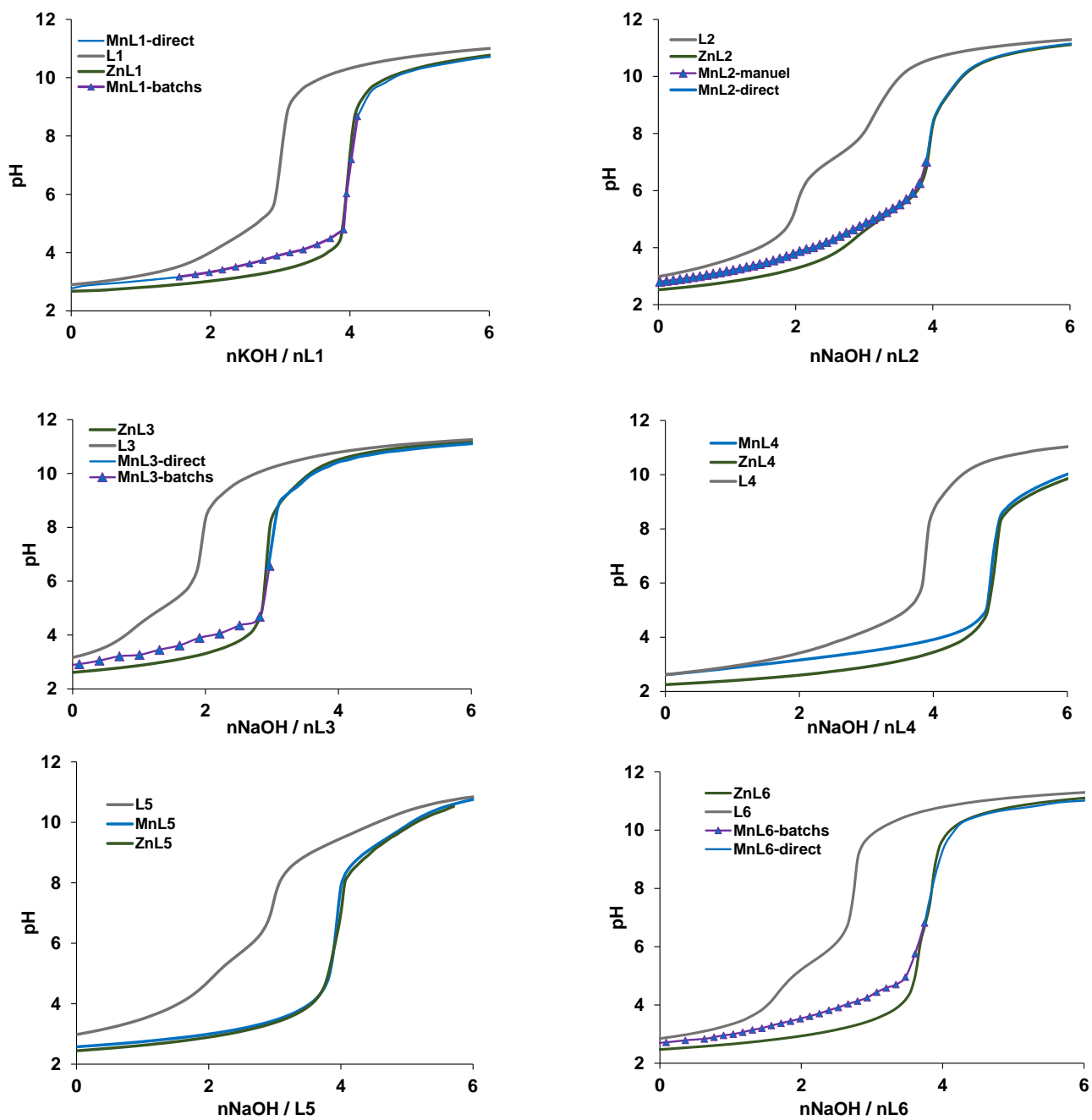


Figure 3.21 : Courbes de titrage potentiométrique des ligands en absence et en présence des métaux Mn^{2+} et Zn^{2+} ; $c_L = c_M = 1,6-1,8 \text{ mM}$; $I = 0,15 \text{ M NaCl et KCl (pour } L^1)$. 25°C .

Relation structure-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

Tableau 3.3: Constantes de protonation des ligands et constantes de protonation et de stabilité des complexes.

	L ¹	L ²	L ³	L ⁴	L ⁵	L ⁶
logK _{H1}	11,44(1)	11,15(1)	9,54(4)	11,37(2)	9,91(1)	10,74(1)
logK _{H2}	10,31(2)	7,35(3)	5,11(6)	10,46(2)	9,05(1)	5,55(1)
logK _{H3}	4,71(5)	3,78(4)	2,99(6)	4,65(3)	5,66(2)	2,89(1)
logK _{H4}	2,76(5)	3,02(5)	1,80(5)	3,40(3)	3,73(2)	1,48(1)
logK _{H5}	2,22(4)	-	-	2,89(3)	2,74(1)	-
logK _{H6}	-	-	-	-	1,40(2)	-
$\Sigma \log K_{Hi}$	31,44	25,26	19,44	32,77	32,49	20,66
logK_{MnL}	12,21(5)	13,72(3)	11,26(4)	12,81(5)	14,40(1)	11,60(4)
logK _{MnHL}	10,42(3)	5,31(2)	3,20(3)	9,54(3)	9,12(1)	4,52(3)
logK _{MnH2L}	3,87(4)	3,90(1)	-	3,70(4)	3,52(1)	-
logK _{MnH3L}	-	-	-	-	2,20(1)	-
logK_{ZnL}	15,59(3)	16,54(4)	13,72(2)	18,49(3)	17,59(3)	14,90(4)
logK _{ZnHL}	10,33(2)	5,43(3)	3,26(1)	9,35(2)	8,94(3)	3,43(2)
logK _{ZnH2L}	3,28(1)	3,39(2)	-	3,44(2)	3,44(3)	-
logK _{ZnH3L}	-	-	-	2,51(2)	2,26(4)	-
pMn^a	6,65	7,28	7,06	6,47	8,48	6,63
pZn^a	8,40	8,76	8,29	9,21	9,98	8,28

^a pM = - log[M_{libre}] ; c_{Mn} = c_L = 10⁻⁵ M, pH 7,4.

Chapitre 3

L'analyse de ces constantes nous permet de tirer un certain nombre de conclusions. Similairement à ce qui était déjà observé dans le cas du L^1 dans le chapitre précédent, les stabilités des complexes de Mn^{2+} restent plutôt modestes en comparaison aux meilleurs ligands décrits par la littérature dans le contexte de l'IRM. En effet, les valeurs de pMn sont toutes moins élevées pour nos ligands penta-dentés (donc les complexes de Mn^{2+} monohydratés) que celles de $[Mn(PyC3A)]^-$ ($pMn = 8,17$) ou $[Mn(PC2A-EA)]^+$ ($pMn = 9,27$), les deux chélates que l'on peut avant tout considérer comme références. Il faut noter quand-même que PyC3A et PC2A-EA sont tous les deux des ligands hexa-dentés (et les complexes monohydratés). Néanmoins, la complexation est complète à pH 6 dans chacun des systèmes $Mn^{2+} - L^{1-6}$ (figure 3.22). En raison de ses six fonctions donneurs, L^5 forme un complexe de Mn^{2+} considérablement plus stable que les autres ligands penta-dentés. La stabilité des complexes de Zn^{2+} est de 3-6 ordres de grandeur supérieure à celle de leur analogue de Mn^{2+} , obéissant à la série d'Irving-Williams.

À pH physiologique, les complexes Mn^{2+} de L^1 , L^4 et L^5 sont monoprotés, mais leur situation n'est pas pareille. Contrairement au $[Mn(HL^1)]$ qui porte le proton sur la lysine, dans le cas de $[Mn(HL^4)]$ et de $[Mn(HL^5)]^-$, c'est l'amine N3 ou N7 du bicycle qui reste protoné et ainsi ne participe pas à la complexation du métal. Ceci est évident, vue la valeur élevée de la constante de protonation des complexes, correspondant clairement à une amine. La situation est identique pour leurs analogues $[Zn(HL^4)]$ et $[Zn(HL^5)]^-$. Ces résultats confirment que ces complexes $[M(HL^4)]$ et $[M(HL^5)]^-$, comme d'ailleurs les ligands non-complexés, ont une conformation qui diffère à celle des autres systèmes (chaise-chaise), et par conséquent, dans les complexes le cation métallique ne se trouve pas dans une « cavité bicyclique ». Il est intéressant de constater que malgré cette conformation à priori moins favorable à la complexation, la stabilité du complexe $[Mn(HL^4)]$ n'est que très légèrement dégradée en comparaison aux autres chélates pentadentés, en conformation chaise-chaise $[(Mn(L^1))$, $[Mn(L^2)]^{2-}$, $[Mn(L^3)]^-$, $[Mn(L^6)]^-$. On peut en déduire que la coordination de l'un des carboxylates portés par le bicycle du L^4 stabilise la complexation. On note aussi que comparés aux autres ligands, L^4 et L^5 forment des complexes de Zn^{2+} plus stables. Cela pourrait signifier que le site de coordination proposé par ces ligands en conformation bateau-chaise est mieux adapté à la taille plutôt petite du Zn^{2+} que le site (cage bicyclique plus large) disponible dans une conformation chaise-chaise.

Relation structure-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

Concernant les complexes $[\text{Mn}(\text{HL}^4)]$ et $[\text{Mn}(\text{HL}^5)]^-$, leur déprotonation en milieu basique n'affecte pas notablement la relaxivité (figure 3.22), même si une légère variation est détectée pour $[\text{Mn}(\text{HL}^4)]$ autour de pH 9. Il est impossible de savoir sans études supplémentaires en RMN par exemple, si la déprotonation de l'amine génère une réorganisation conformationnelle du complexe, mais l'invariance de la relaxivité suggère que les paramètres qui interviennent dans la détermination de la relaxivité ne sont pas affectés.

Comme c'est souvent le cas dans une famille de ligand, la valeur de la constante de stabilité est directement corrélée à la basicité des ligands ($\sum \log K_{\text{Hi}}$) au sein de la série des bispidines portant le méthyle en position N3 et l'acétate en N7, à l'exception du dérivé phosphonate L^2 ; la stabilité accroît avec l'augmentation de la basicité. La substitution de la fonction carboxylate (L^3) par un phosphonate (L^2) engendre l'augmentation modérée de la stabilité aussi bien pour le Mn^{2+} que pour le Zn^{2+} . Le même phénomène a été observé par exemple pour les ligands 1,7- $\text{H}_4\text{do}2\text{a}$ et 1,7- $\text{H}_2\text{do}2\text{p}$, avec des $\log K_{\text{MnL}}$ respectives de 14,54²¹⁻²² et 18,10²³.

Chapitre 3

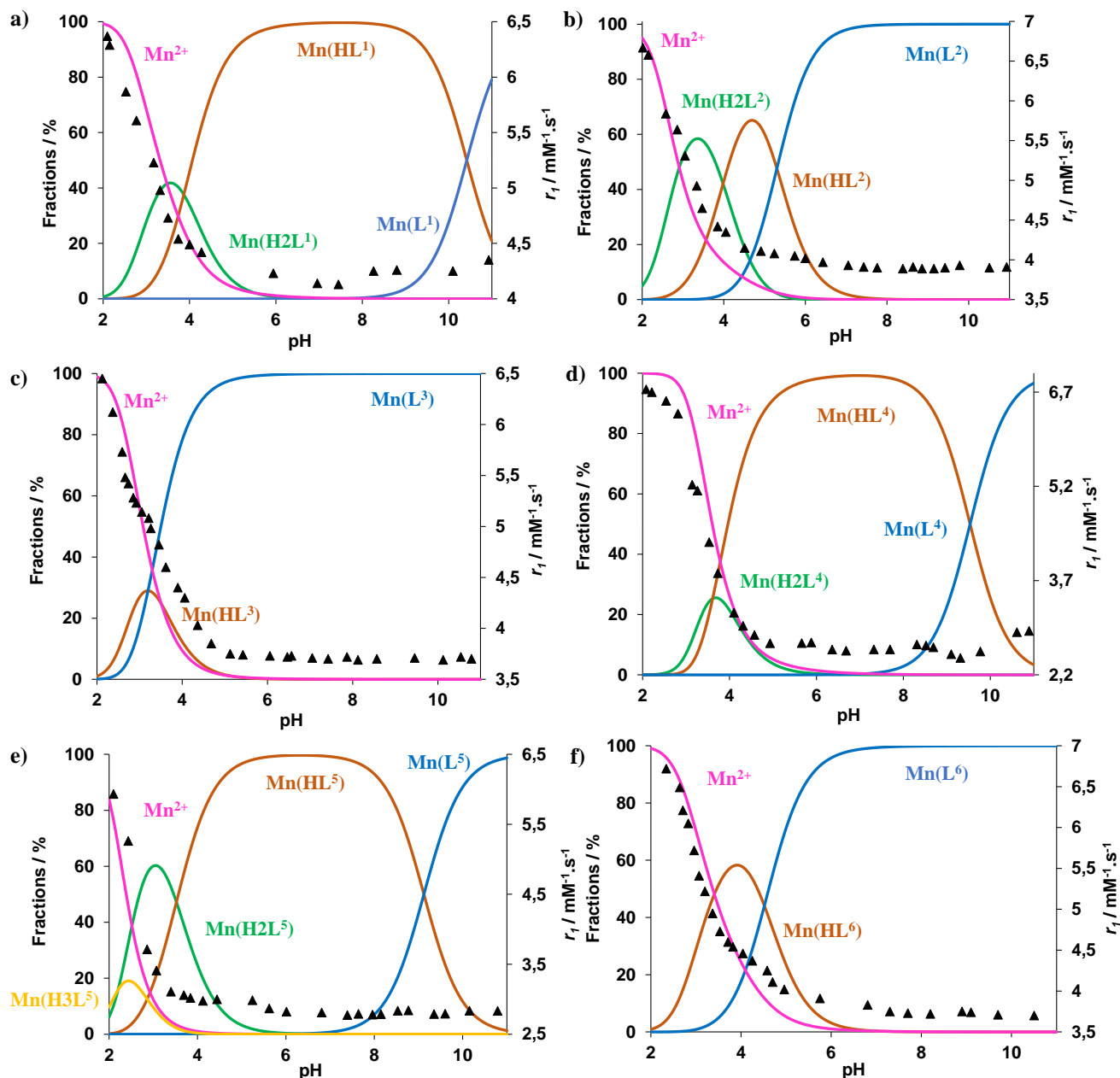
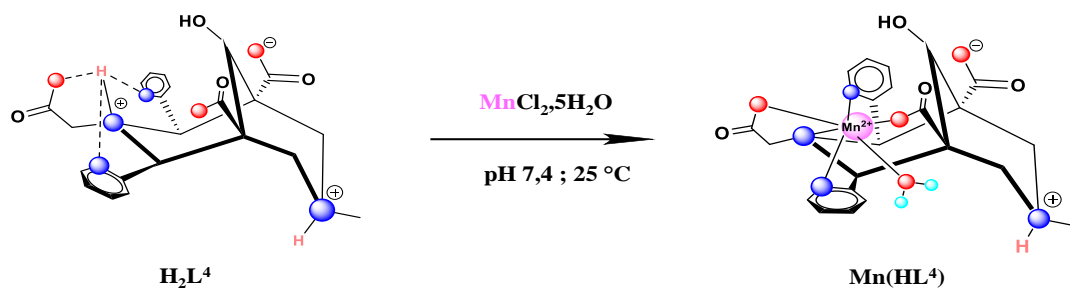


Figure 3.22 : Distribution des espèces et variation de la relaxivité en fonction du pH: a) Mn/L^1 ; b) Mn/L^2 ; c) Mn/L^3 ; d) Mn/L^4 ; e) Mn/L^5 ; f) Mn/L^6 . $c_{\text{Mn}^{2+}} = c_{\text{lig}} = 1 \text{ mM}$.

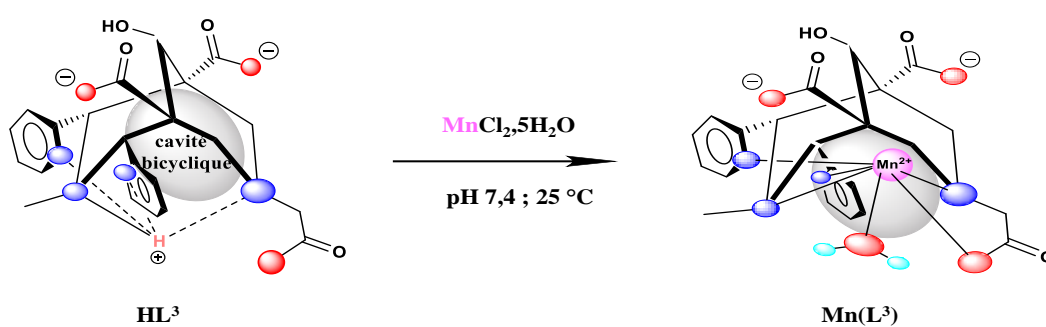
Sur la base de tous ces résultats, la complexation des différents ligands peut être comme illustrée sur la figure 3.23.

Relation structure-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

a) Complexation très rapide



b) Complexation relativement lente



c) Complexation lente

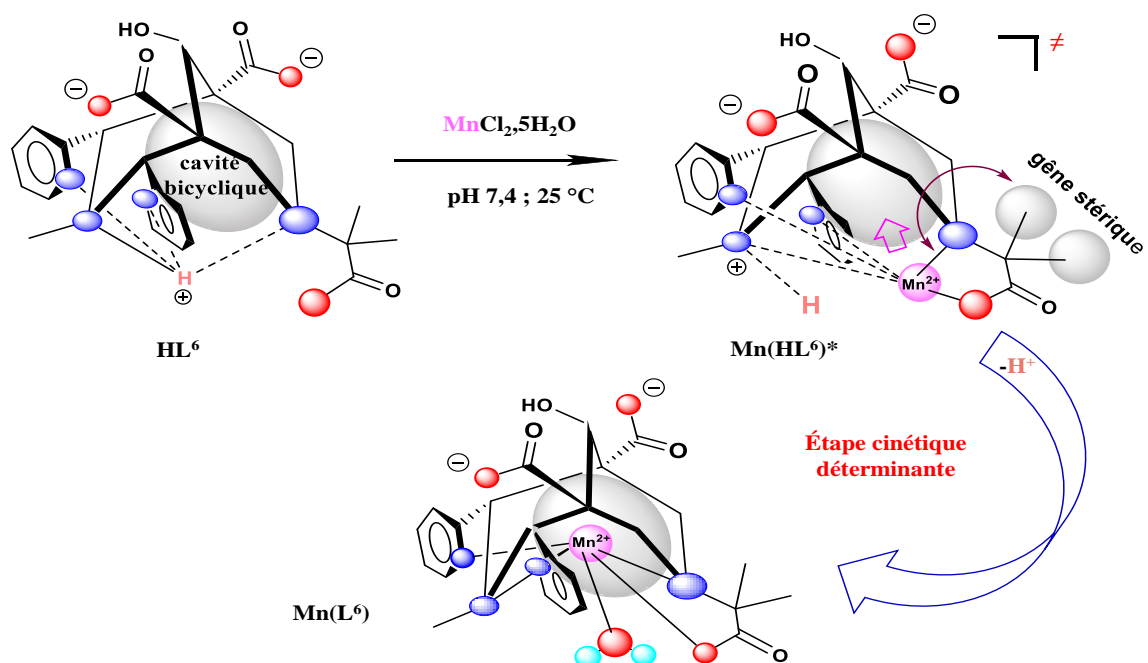


Figure 3.23 : Illustrations représentatives de la complexation des différents ligands à pH 7.

Chapitre 3

En résumé, dans cette classe des ligands de type bispidine, la fonctionnalisation de l'azote N3 du bicycle est déterminante sur les propriétés cinétiques et thermodynamiques de complexation :

a) : Quand l'azote N3 porte un acétate (L^4 et L^5), les ligands sont diprotonés à pH 7 sur le bicycle et possèdent une conformation bateau-chaise. A pH physiologique, leur complexation avec le Mn^{2+} est très rapide, ne conduit probablement pas à un changement de la conformation, et l'une des amines du bicycle reste protonée dans les complexes. Cette situation est représentée par le cas du $[Mn(HL^4)]$ sur la figure 3.23.

b et c) : En revanche, les ligands qui ont un méthyle sur l'azote N3 ne peuvent porter qu'un seul proton sur le bicycle ($N^3-H---N^7$). Ils possèdent une conformation chaise-chaise et donc une cavité bicyclique pour la complexation métallique. A pH physiologique, la formation de leur complexe de Mn^{2+} est plus au moins lente en fonction de l'encombrement stérique du groupement en position α par fonction portée par l'azote N7, et les complexes formés ne sont pas protonés. Cette situation est représentée par le cas des complexes $[Mn(L^3)]^-$ et $[Mn(L^6)]^-$ sur la figure 3.23.

A cause de la formation lente, pour toute utilisation lors des études de caractérisation et *in vivo*, ces complexes sont préparés en mélangeant des quantités équimolaires de Mn^{2+} et de ligand, à pH 7, 65 °C, pendant 30 min. Le pH est régulièrement contrôlé et ajusté par l'addition d'une solution de base (NaOH).

2.2. Influence de la nature et de la position des groupements fonctionnels sur les propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

Afin d'établir une corrélation entre la nature et la position des groupements fonctionnels des bispidines étudiées dans ce chapitre et les propriétés physico-chimiques de leurs complexes de Mn^{2+} , nous avons étudié l'ensemble des complexes de Mn^{2+} (Mn/L^{1-8}). Dans un souci de clarté et vu le très grand nombre de systèmes à comparer et la quantité des résultats à analyser, nous avons décidé de les présenter en différents sous-chapitres. Nous allons d'abord discuter sur leur inertie et par la suite les propriétés de relaxation seront présentées. Dans chacune de ces deux parties, différents groupes de complexes seront comparés entre eux. Cela nous permet de tirer

Relation structure-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

des conclusions de façon plus claire par rapport à l'influence d'un changement structural spécifique sur le ligand (par exemple la substitution d'un carboxylate par un phosphonate, ou le remplacement des carboxylates non-coordinants par des fonctions OH sur le bicycle).

2.2.1. Inertie des chélates de Mn(L)

Aujourd'hui, il est généralement reconnu que l'inertie des complexes est plus primordiale que leur stabilité quand une application *in vivo*, par exemple comme agents de contraste en IRM, est envisagée;²⁴ du fait qu'une éventuelle toxicité de ces complexes est intimement liée à la libération du métal dans le milieu sous forme libre, donc à l'inertie.

Dans l'objectif d'évaluer l'inertie des complexes, différentes expériences peuvent être réalisées, mais le plus souvent il s'agit des réactions de transmétallation. De façon générale, la dissociation du complexe peut se faire (i) par voie spontanée, (ii) par catalyse acide, ou (iii) par assistance d'un cation métallique (figure 3.24). Ces différentes voies contribuent à la dissociation en fonction des conditions expérimentales et des propriétés intrinsèques du complexe.

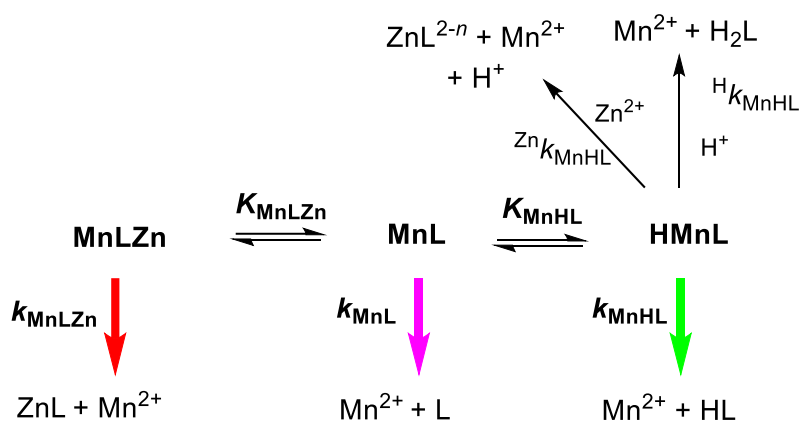


Figure 3.24 : Les différentes voies susceptibles de contribuer à la dissociation des complexes MnL.

En présence d'un excès de Zn^{2+} , la vitesse de la réaction peut être exprimée comme suit, où k_{obs} est la constante de vitesse de pseudo-premier ordre et $[MnL]_{tot}$ correspond à la concentration du complexe :

$$-\frac{d[MnL]_{tot}}{dt} = k_{obs} \times [MnL]_{tot} \quad \text{équation 3.3}$$

Chapitre 3

Si on considère l'ensemble des voies de dissociation, la vitesse de la réaction peut être exprimée :

$$-\frac{d[MnL]_{tot}}{dt} = k_{MnL}[MnL] + k_{MnLZn}[MnLZn] + k_{MnHL}[MnHL] + {}^Hk_{MnHL}[MnHL] \cdot [H^+] + {}^{Zn}k_{MnHL}[MnHL] \cdot [Zn^{2+}] \quad \text{équation 3.4}$$

Dans cette équation, chaque terme correspond à une voie de dissociation. La concentration totale de MnL est la somme des concentrations des complexes protonés et dinucléaires, donc on peut exprimer k_{obs} par :

$$k_{obs} = \frac{k_0 + k_1[H^+] + k_2[H^+]^2 + k_3[Zn^{2+}] + k_4[H^+][Zn^{2+}]}{1 + K_{MnL}^H[H^+] + K_{MnLZn}[Zn^{2+}]} \quad \text{équation 3.5}$$

où $k_0 = k_{MnL}$, $k_1 = k_{MnHL} \cdot K_{MnHL}$, $k_2 = K_{MnHL} \cdot {}^Hk_{MnHL}$, $k_3 = k_{MnLZn} \cdot K_{MnLZn}$, $k_4 = {}^{Zn}k_{MnHL} \cdot K_{MnHL}$.

K_{MnHL} est la constante de protonation du complexe déterminée par potentiométrie, et K_{MnLZn} est la constante de stabilité du complexe dinucléaire formé avec le Zn.

Nous avons suivi des réactions de transmétallation avec du Zn^{2+} dans des conditions de pseudo-premier ordre, en mettant en jeu 50 équivalents de Zn^{2+} par rapport au complexe à différents pH (3,13 à 6,00, dans des solutions tamponnées), à 37 °C. Pour suivre la dissociation, nous avons mesuré le temps de relaxation longitudinale ou transversale en fonction du temps (figure 3.26).

Les conditions (pH 6, 37 °C et 50 équivalents de Zn^{2+}) représentent un protocole qui devient de plus en plus standard dans l'étude des complexes de MnL et les temps de demi-vie calculés pour ces conditions sont souvent utilisés pour obtenir une comparaison simple et directe des inerties. En effet, des études très complètes permettant de décrire tous les mécanismes de dissociation et de déterminer les constantes de vitesse pour chacun des mécanismes sont souvent chronophages, fastidieuses et complexes à réaliser. La comparaison des données obtenues dans des conditions expérimentales souvent très différentes pour les complexes dont les mécanismes de dissociation diffèrent est problématique. Pour ces raisons-là, il est utile de définir un protocole simple qui permet une comparaison directe entre les complexes, même s'il

Relation structure-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

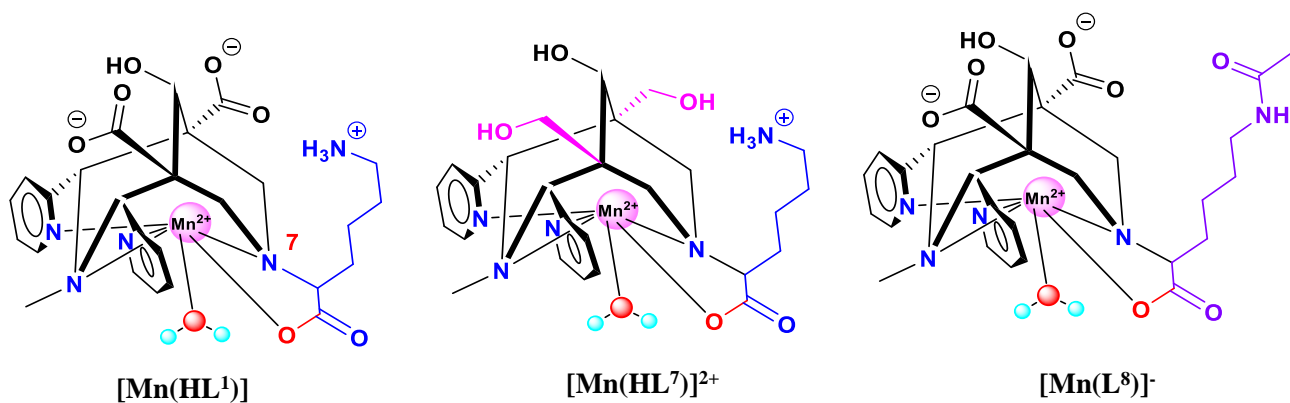
faut être conscient qu'une autre comparaison dans des conditions, même légèrement différentes, peut conduire à une conclusion différente sur l'ordre des inerties. On note également que pour certains de nos complexes ces conditions « standards » ne sont pas adaptées pour une comparaison quantitative car la dissociation est trop lente à pH 6 et ne permet pas le calcul du temps de demi-vie.

2.2.1.1. Influence de la nature des groupements fonctionnels en position N7 sur l'inertie des complexes

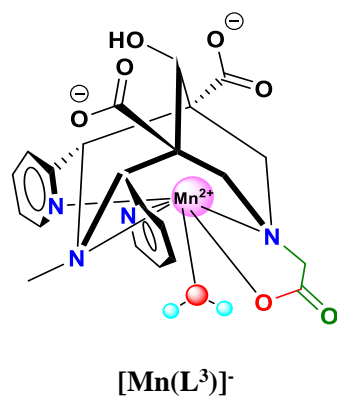
Dans un premier temps, nous allons analyser l'effet du substituant sur la position N7 en étudiant les complexes des ligands L¹, L², L³, L⁷ et L⁸. L'ensemble de ces ligands portent un groupement méthyle sur N3 et un atome donneur sur N7. Ils peuvent être seulement monoprotonés sur le bicycle (N³-H---N⁷) et possèdent donc une conformation chaise-chaise (figure 3.25).

Les courbes de la variation de la relaxation longitudinale ou transversale en fonction du temps dans des solutions Mn/L au cours de la transmétallation avec du Zn²⁺ sont représentées sur la figure 3.26. L'ajustement de ces courbes a permis de calculer les constantes de vitesse, k_{obs} , et les temps de demi-vie, $t_{1/2}$ à chaque valeur du pH (tableau 3.4).

Dérivé « lysine »



Dérivé « glycine »



Dérivé « phosphonate »

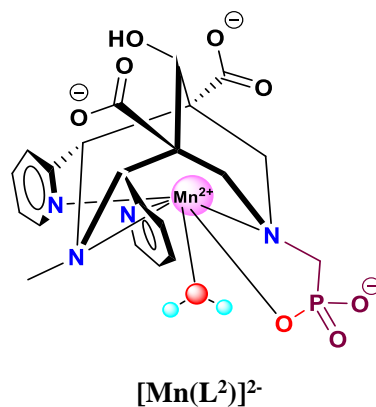


Figure 3.25 : Complexes Mn(Bispidine) étudiés pour relier l'inertie cinétique à la nature du groupement fonctionnel porté par le cycle pipéridine(N7).

Relation structure-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

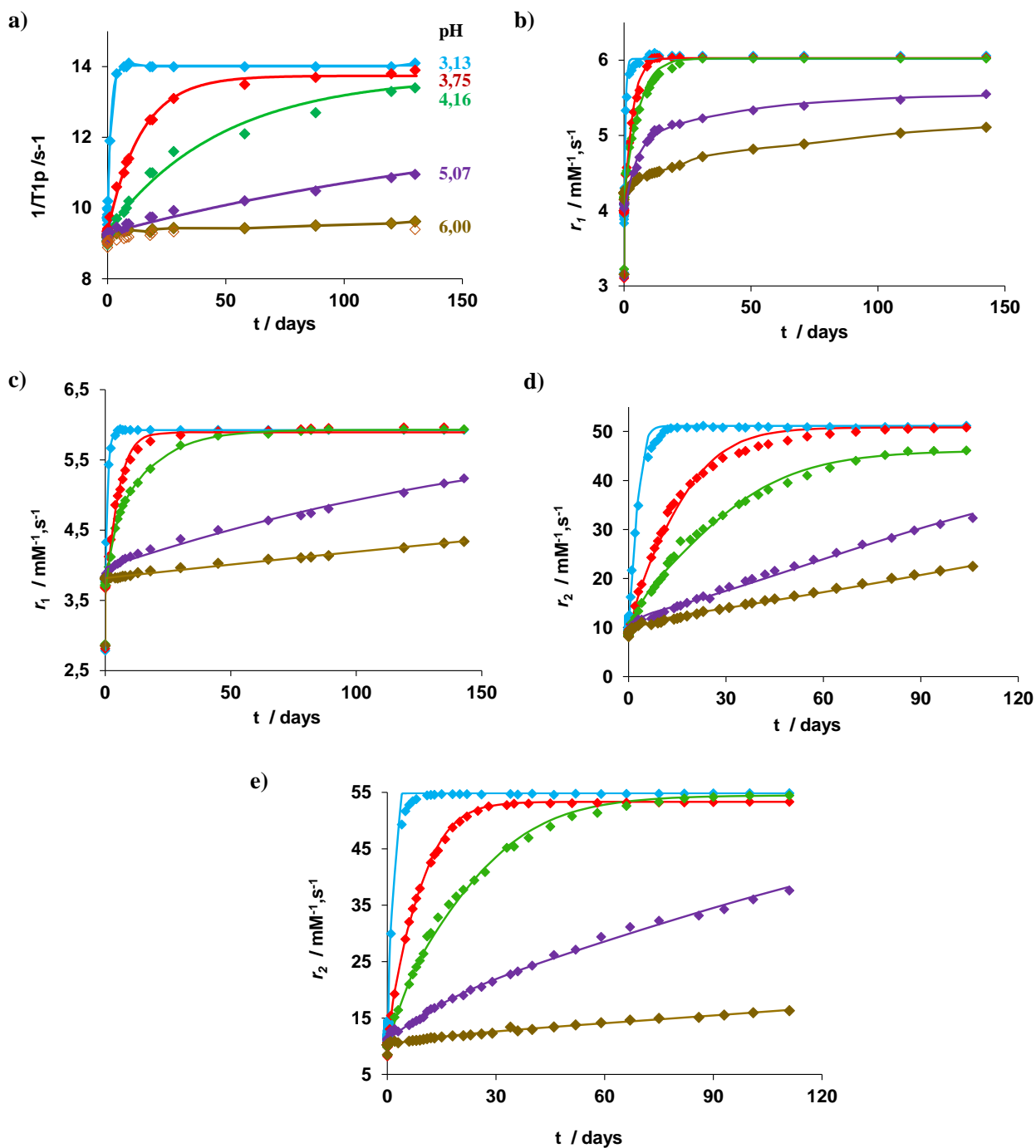


Figure 3.26 : Variation du $1/T_1$, r_1 ou r_2 en fonction du temps au cours de la transmétallation par le Zn^{2+} pour a) $Mn(HL^1)$; b) $[Mn(L^2)]^{2-}$; c) $[Mn(L^3)]^-$; d) $[Mn(HL^7)]^{2+}$; e) $[Mn(L^8)]^-$. 60 MHz, 37 °C, $c_{[MnL]} = 1 \text{ mM}$, $c_{Zn} = 50 \text{ mM}$, dans des solutions tamponnées. Les courbes représentent les ajustements des données expérimentales par une fonction mono-exponentielle.

Chapitre 3

Tableau 3.4: Constantes de vitesse de dissociation (k_{obs}) et $t_{1/2} = \ln 2/k_{obs}$ des complexes étudiés.

Complexes	$k_{obs} / 10^{-6} (s^{-1}) / t_{1/2} (pH\ 3,1)$	$k_{obs} / 10^{-6} (s^{-1}) / t_{1/2} (pH\ 3,7)$	$k_{obs} / 10^{-6} (s^{-1}) / t_{1/2} (pH\ 4,1)$	$k_{obs} / 10^{-6} (s^{-1}) / t_{1/2} (pH\ 5,1)$
[Mn(HL ¹)]	8,47(3) / 22 h	0,82(1) / 10 j	0,24(1) / 33 j	0,06(1) / 137 j
[Mn(L ²)] ²⁻	24,93(5) / 7,72 h	4,37(2) / 1,84 j	2,45(1) / 3,27 j	0,28(5) / 28,65 j
[Mn(L ³)] ⁻	14,33(4) / 13,44 h	3,2(2) / 2,51 j	1,79(2) / 4,48 j	0,11(5) / 72,93 j
[Mn(HL ⁷)] ²⁺	9,14(3) / 21,06 h	1,21(2) / 6,63 j	0,66(1) / 12,16 j	0,22(3) / 36,47 j
[Mn(L ⁸)] ⁻	20,02(5) / 9,62 h	2,01(2) / 4,01 j	0,80(1) / 10,03 j	0,17(3) / 47,19 j

Pendant la durée de l'expérience (max. 150 jours), on observe une décomplexation totale dans chacun des échantillons à pH 3,13, 3,75 et 4,16, avec des temps de demi-vie allant de 8 h à 33 jours. Cependant, à pH 5,1 et 6,0, la dissociation est très lente, voire "inexistante" [(Mn(HL¹))], confirmant une inertie exceptionnelle pour l'ensemble de ces complexes des bispidines fonctionnalisées au niveau du cycle pipéridine(N7). Le [Mn(HL¹)] reste toujours le plus inerte, avec des k_{obs} d'à peu près un ordre de grandeur plus petits par rapport aux autres complexes dans cette famille. D'ailleurs, cette haute inertie rend difficile leur comparaison avec les complexes de Mn²⁺ hydratés qu'on retrouve dans la littérature parmi lesquels le plus inerte est [Mn(PC2A-EA)]⁺, avec un temps de demi-vie de 54,4 h²⁵ (25 equ Zn²⁺, 37 °C, pH 6).

Au sein de la série, l'inertie reste assez similaire pour les dérivés lysine (sauf [Mn(HL¹)] et glycine, alors que le dérivé phosphonate [Mn(L²)]²⁻ est le moins inerte. L'inertie réduite des dérivés phosphonate a été régulièrement observée pour les complexes de lanthanides, en raison de la présence de plusieurs complexes protonés qui facilitent la dissociation proton-assistée.²⁶ Dans le but d'estimer la contribution de la voie assistée par le Zn²⁺, nous avons suivi la transmétallation du complexe [Mn(HL¹)] aux pH 3,1 et 4,8 en présence de Zn²⁺ à des concentrations variables (10, 20, 30, 40 ou 50 equ). Les résultats sont illustrés sur la figure 3.27.

Relation structure-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

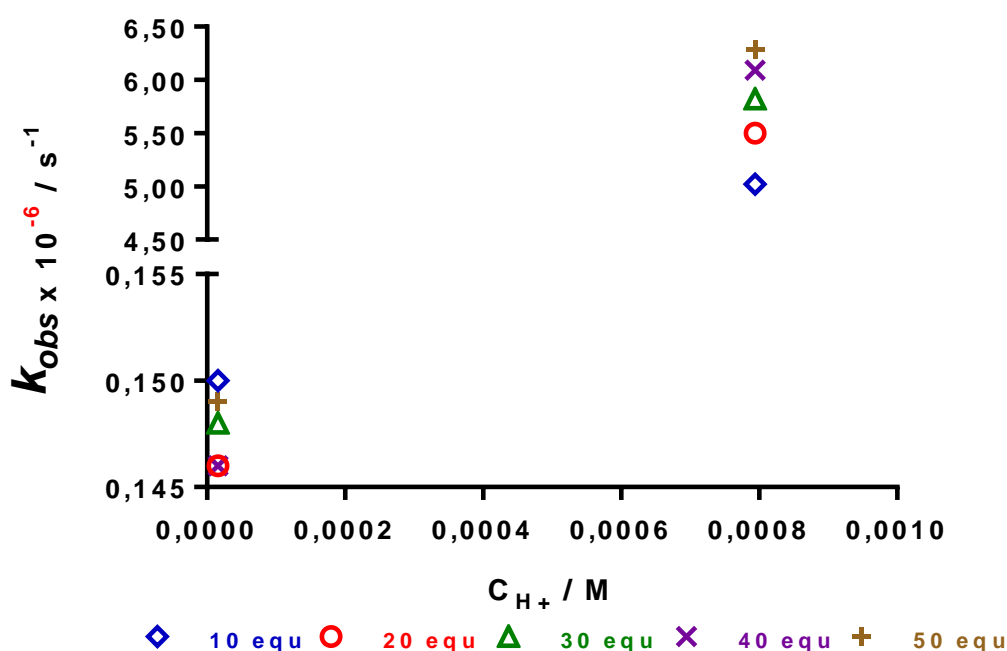


Figure 3.27 : Variation de k_{obs} en fonction de la concentration de Zn^{2+} aux pH 3,1 et 4,8 pour le complexe $[Mn(HL^1)]$. 25 °C.

À pH 4,8, la valeur de k_{obs} reste strictement constante et elle varie de très peu à pH 3,1. Cette petite variation ne permet pas de décrire une dépendance du Zn^{2+} et suggère que la contribution de la voie de dissociation assistée par le Zn^{2+} est négligeable. Afin d'estimer les constantes qui caractérisent la voie de dissociation proton-catalysée, les valeurs de k_{obs} (déterminées à 50 équivalents de Zn^{2+}) vs. C_H ont été fittées en utilisant l'équation 3.6 (figure 3.28).

$$k_{obs} = k_0 + k_1 [H^+] + k_2 [H^+]^2 \quad \text{équation 3.6}$$

Comme dans le cas du $[Mn(HL^1)]$ décrit dans le chapitre précédent, nous considérons que la dissociation spontanée est négligeable et k_0 a été fixé à 0. Les données montrent une dépendance de second ordre en concentration de protons, mais vu le nombre très limité des points à fitter, le fit peut être considéré comme une estimation très approximative des valeurs de k_1 et surtout de k_2 , qui sont représentées dans le tableau 3.5.

Chapitre 3

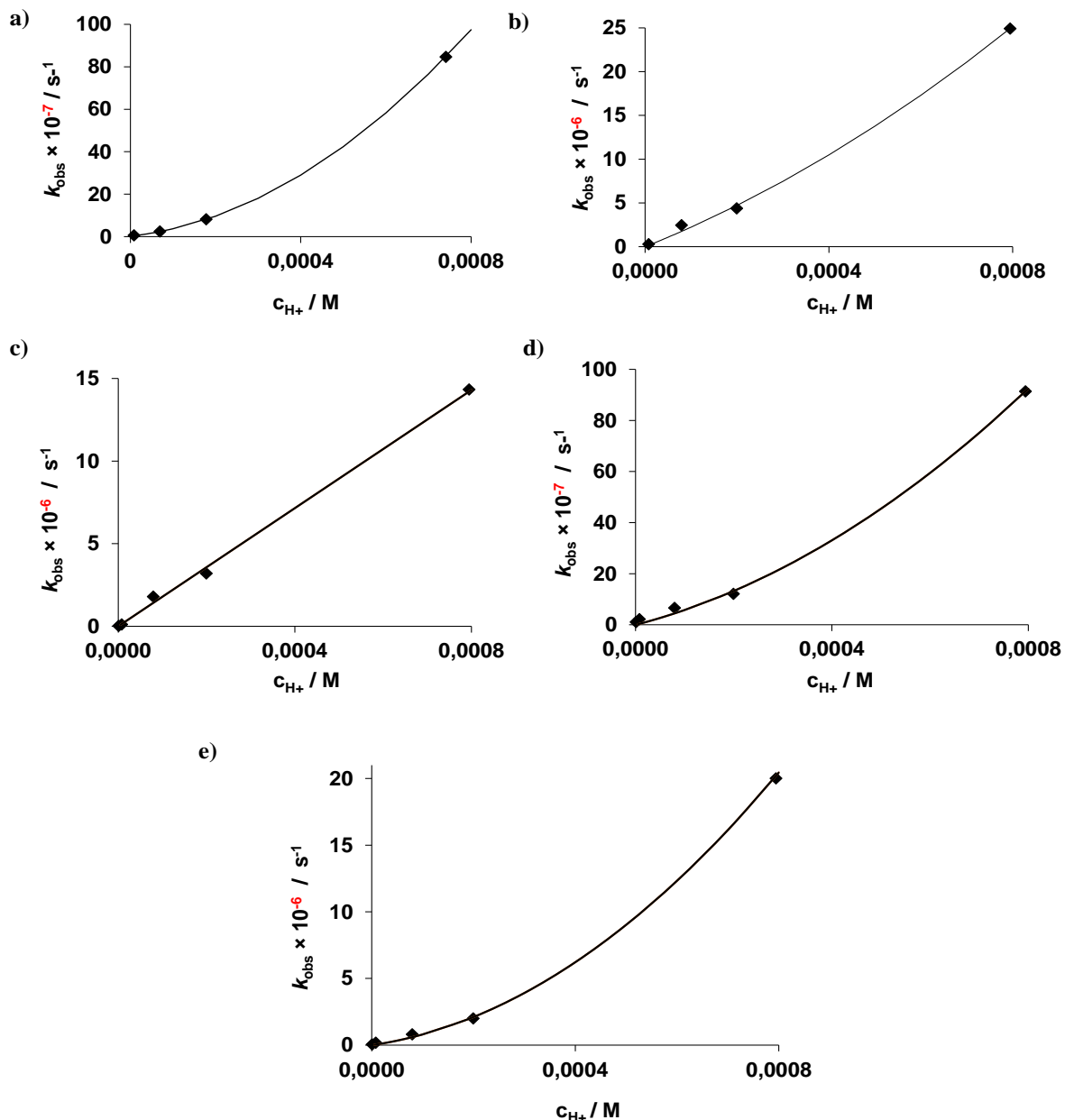


Figure 3.28 : Variation du k_{obs} en fonction de la concentration en H^+ . a) $[Mn(HL^1)]^-$; b) $[Mn(L^2)]^{2-}$; c) $[Mn(L^3)]^-$; d) $[Mn(HL^7)]^{2+}$; e) $[Mn(L^8)]^-$. Les courbes représentent les ajustements.

Relation structure-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

Tableau 3.5: Constantes de vitesse de dissociation de la voie proton-assistée (k_1 , k_2) des complexes étudiés.

Complexes	[Mn(HL ¹)]	[Mn(L ²)] ²⁻	[Mn(L ³)] ⁻	[Mn(HL ⁷)] ²⁺	[Mn(L ⁸)] ⁻
$k_1 / 10^{-3} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	2,2(2)	21,1(5)	17,9(5)	4,9(2)	5,5(2)
$k_2 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	12(2)	13(4)	-	8(1)	25(2)

Les valeurs de k_1 sont de 2-5 ordres de grandeur plus petites que celles des complexes de Mn²⁺ hydratés que l'on trouve dans la littérature,^{22, 25, 27} et illustrent encore une fois l'inertie exceptionnelle de ces complexes de Mn²⁺ basés sur des bispidines pré-organisées et rigides.

2.2.1.2. Influence de la fonctionnalisation de l'azote N3 par un méthyle ou par un acétate

Par la suite, nous allons nous intéresser à l'influence de la fonctionnalisation du bicyclic en positions N7 et N3. Nous allons comparer [Mn(L³)]⁻ et [Mn(HL⁴)], qui sont des isomères de position, fonctionnalisés respectivement en N7 et N3 par un acétate, alors que l'autre amine du bicyclic porte le méthyle. Nous allons aussi examiner le cas de [Mn(HL⁵)]⁻, fonctionnalisé sur les deux positions N7 et N3 par un acétate. Cette comparaison nous permettra de voir si l'inertie des complexes de Mn²⁺ est affectée par la conformation de la bispidine, et donc de la présence [(Mn(L³)]⁻) ou l'absence ([Mn(HL⁴)] et [Mn(HL⁵)]⁻) d'une cavité bicyclique pour coordiner le métal. En effet, précédemment, les études potentiométriques et RMN ont mis en évidence une conformation chaise-chaise pour les ligands monoprotonés sur le bicyclic (N³-H---N⁷; L³) et bateau-chaise pour les ligands diprotonés (N³-HH-N⁷; L⁴, L⁵). A pH 7, ces conformations sont très probablement maintenues dans les complexes de Mn²⁺ respectifs, qui n'ont pas le même état de protonation non plus : Mn/L³ est déprotoné et Mn/L⁴, Mn/L⁵ sont monoprotonés. La figure 3.29 représente la structure des complexes étudiés.

Chapitre 3

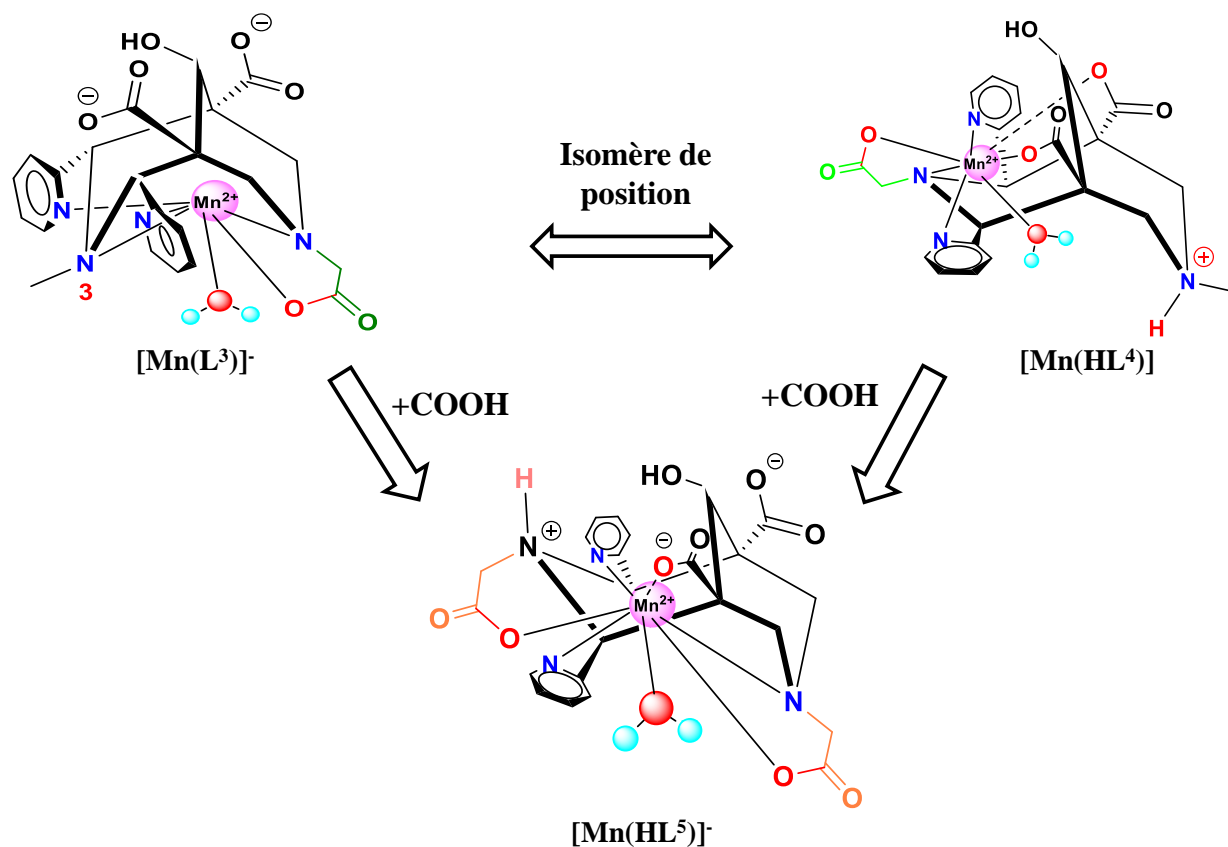


Figure 3.29 : Structures des complexes étudiés.

Les études de cinétique de dissociation ont été faites dans les mêmes conditions que précédemment. La figure 3.30 représente l'évolution de la relaxivité transversale ou longitudinale en fonction du temps au cours de la transmétallation avec le Zn^{2+} .

Relation structure-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

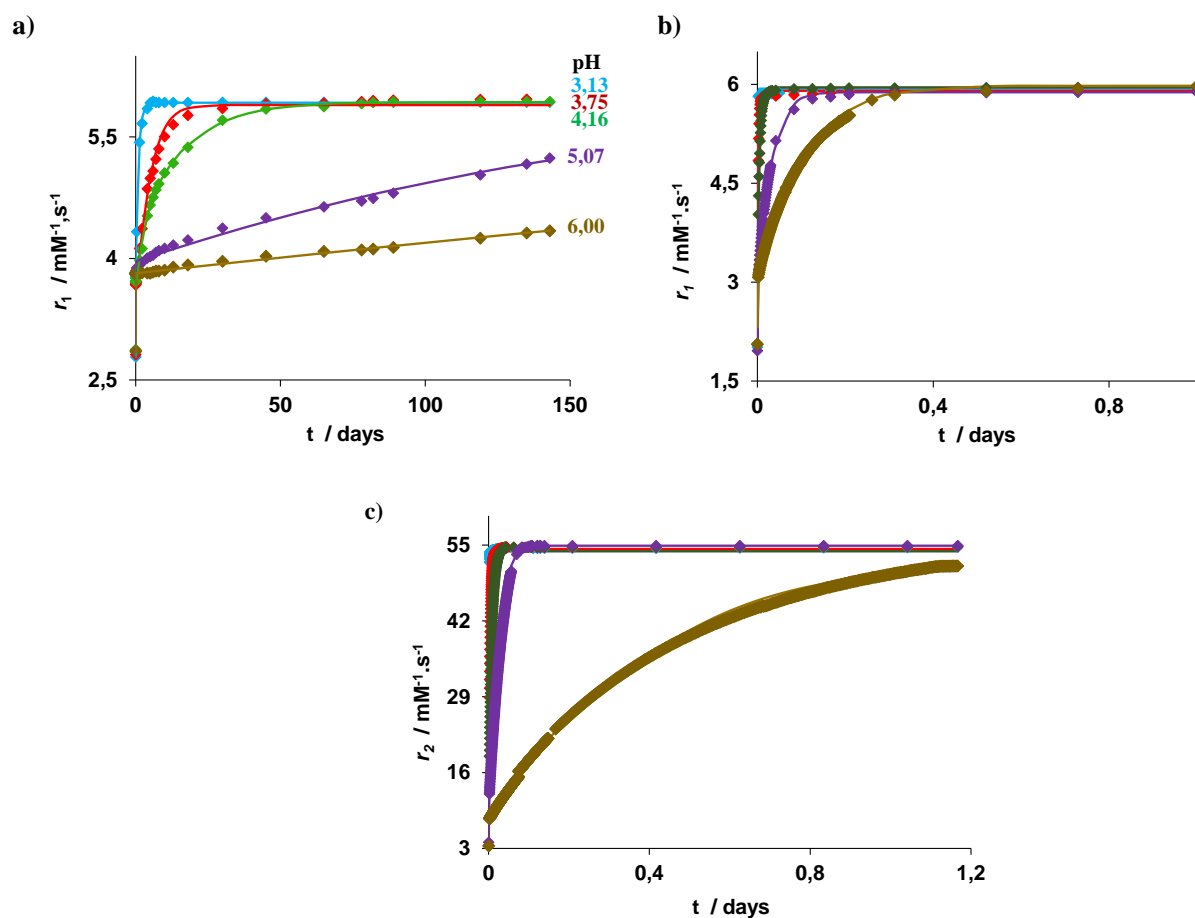


Figure 3.30 : Evolution de la relaxivité longitudinale ou transversale en fonction du temps. a) $[\text{Mn}(\text{L}^3)]^-$; b) $[\text{Mn}(\text{HL}^4)]^-$; c) $[\text{Mn}(\text{HL}^5)]^-$. $c_{[\text{MnL}]} = 1 \text{ mM}$, $c_{\text{Zn}} = 50 \text{ mM}$, 60 MHz ; $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Les courbes représentent les ajustements.

La décomplexation totale des complexes $[\text{Mn}(\text{HL}^4)]^-$ et $[\text{Mn}(\text{HL}^5)]^-$ se réalise en moins de trois minutes à pH 3,13, alors que $[\text{Mn}(\text{L}^3)]^-$ se dissocie au bout de sept jours dans les mêmes conditions.

Les k_{obs} obtenus des calculs sont représentés dans le tableau 3.6.

Chapitre 3

Tableau 3.6: Constantes de vitesse de dissociation (k_{obs}) et $t_{1/2} = \ln 2/k_{obs}$ des complexes étudiés.

Complexes	$k_{obs} (s^{-1}) / t_{1/2}$	$k_{obs} (s^{-1}) / t_{1/2}$	$k_{obs} (s^{-1}) / t_{1/2}$	$k_{obs} (s^{-1}) / t_{1/2}$	$k_{obs} (s^{-1}) / t_{1/2}$
	(pH 3,1)	(pH 3,7)	(pH 4,1)	(pH 5,1)	(pH 6,0)
$[Mn(L^3)]^-$	$14,33(4) \times 10^{-6}$ / 13,44 h	$3,2(2) \times 10^{-6}$ / 2,51 j	$1,79(2) \times 10^{-6}$ / 4,48 j	$0,11(5) \times 10^{-6}$ / 72,93 j	$0,03(2) \times 10^{-6}$ / -
$[Mn(HL^4)]$	$23,88(4) \times 10^{-3}$ / 0,48 min	$10,63(2) \times 10^{-3}$ / 1,09 min	$4,58(2) \times 10^{-3}$ / 2,52 min	$0,43(1) \times 10^{-3}$ / 26,87 min	$0,13(1) \times 10^{-3}$ / 1,48 h
$[Mn(HL^5)]^-$	$31,29(5) \times 10^{-3}$ / 0,37 min	$13,54(2) \times 10^{-3}$ / 0,85 min	$8,01(2) \times 10^{-3}$ / 1,44 min	$0,78(1) \times 10^{-3}$ / 14,81 min	$0,05(1) \times 10^{-3}$ / 3,85 h

La comparaison des constantes de vitesse révèle une différence de 3-4 ordres de grandeur entre $[Mn(L^3)]^-$ et les complexes $[Mn(HL^4)]$ et $[Mn(HL^5)]^-$, avec des temps de demi-vie estimés respectivement à 4,48 jours, 2,52 min et 1,26 min, à pH 4,1. Ces résultats montrent très clairement que la conformation chaise-chaise du ligand, donc l'existence d'une cavité bicyclique qui encapsule le Mn^{2+} , a un rôle primordial pour obtenir une grande inertie de ces complexes.

Dans le but d'évaluer la contribution des différentes voies qui mènent à la dissociation des complexes $[Mn(HL^4)]$ et $[Mn(HL^5)]^-$, nous avons étudié la dissociation à différentes concentrations en Zn^{2+} (10, 20, 30, 40, 50 equ) aux pH 3,7 et 5,1. La figure 3.31-a représente la variation du k_{obs} en fonction du pH à différentes concentrations en Zn^{2+} .

Relation structure-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

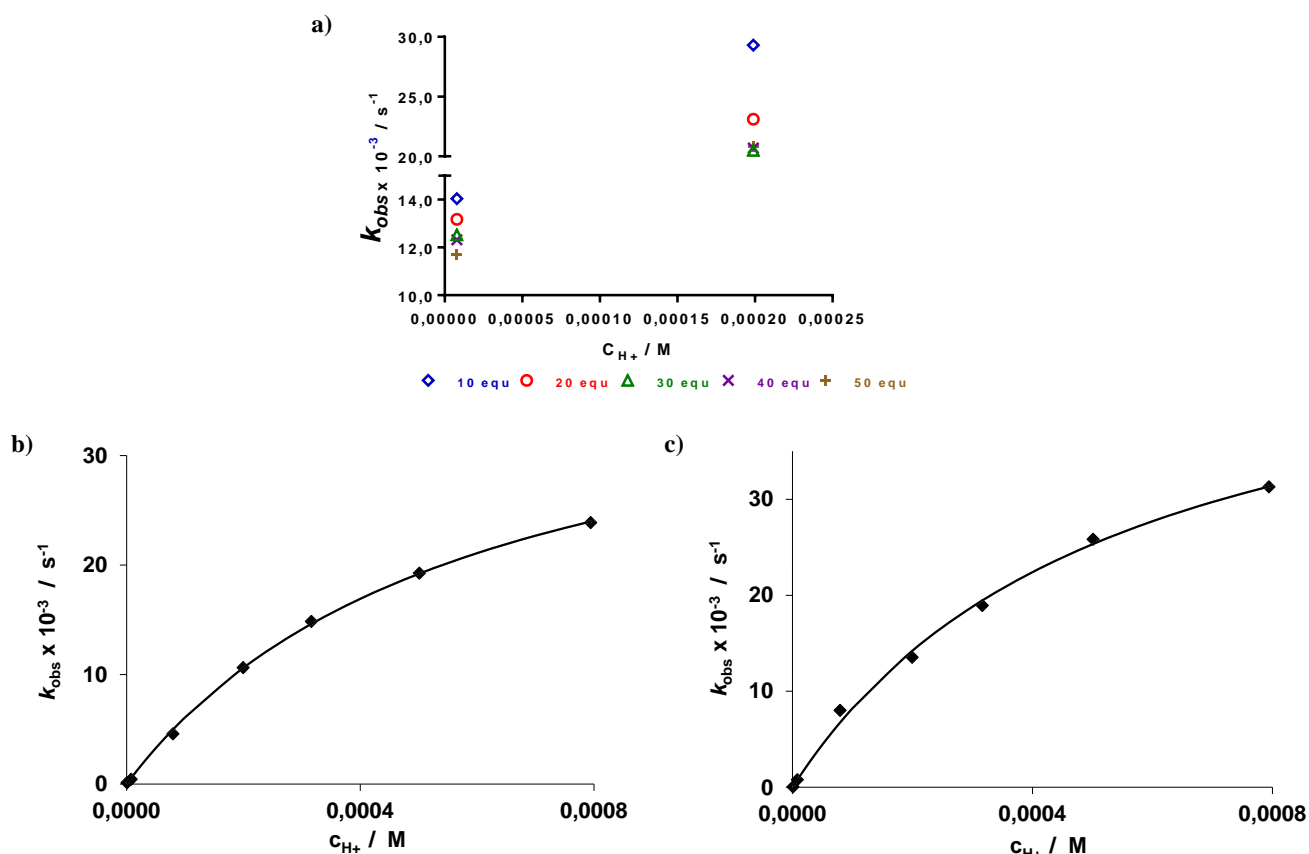


Figure 3.31 : a) Variation de k_{obs} en fonction de la concentration en H^+ à différentes concentrations en Zn^{2+} pour $[\text{Mn}(\text{HL}^4)]$. b-c) Variation de k_{obs} en fonction de la concentration en H^+ avec la présence de 50 equ de Zn^{2+} ; avec b) : $[\text{Mn}(\text{HL}^4)]$ et c) : $[\text{Mn}(\text{HL}^5)]^-$.

Pour un pH donné, la constante de vitesse (k_{obs}) diminue avec l'augmentation de la concentration en Zn^{2+} . Ce fait, qui n'est pas rare en cinétique de dissociation, est la conséquence de la formation d'un complexe dinucléaire $[\text{Mn}(\text{L})\text{Zn}]$ qui se dissocie moins vite que le complexe protoné $[\text{Mn}(\text{HL})]$. Dans l'attente de l'obtention de données supplémentaires pour ces deux systèmes $[\text{Mn}(\text{HL}^4)]$ et $[\text{Mn}(\text{HL}^5)]^-$ à pH et c_{Zn} variables, ce qui nous permettra de réaliser une analyse complète pour calculer toutes les constantes de vitesse caractéristiques, nous avons simplement tracé les valeurs de k_{obs} obtenues à 50 équivalents de Zn^{2+} en fonction de l'acidité (figure 3.31). La forme de ces courbes, très différente de ce que nous avons eu pour $[\text{Mn}(\text{L}^3)]^-$ (figure 3.28) indique que la différence entre $[\text{Mn}(\text{HL}^4)]$, $[\text{Mn}(\text{HL}^5)]^-$ et $[\text{Mn}(\text{L}^3)]^-$ ne concerne pas seulement la vitesse, mais également le mécanisme de dissociation.

2.2.1.3. Influence des substituants en position α du groupement fonctionnel sur N7 sur l'inertie du $[\text{Mn}(\text{L})]^-$

Cette étude a été réalisée en comparant les complexes portant des atomes hydrogène $[(\text{Mn}(\text{L}^3))]^-$ ou deux méthyles $[(\text{Mn}(\text{L}^6))]^-$ en position α de la fonction carboxylate sur l'azote N7 (figure 3.32). Pour $[\text{Mn}(\text{L}^6)]^-$, les expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles des autres complexes. La figure 3.33 montre la variation des vitesses de relaxation au cours de la transmétallation et le tableau 3.7 représente les constantes de vitesse de dissociation obtenues aux différents pH.

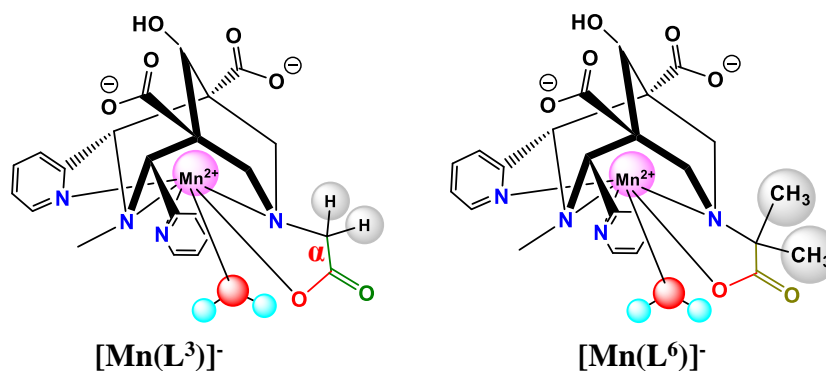


Figure 3.32 : Structures des complexes étudiés.

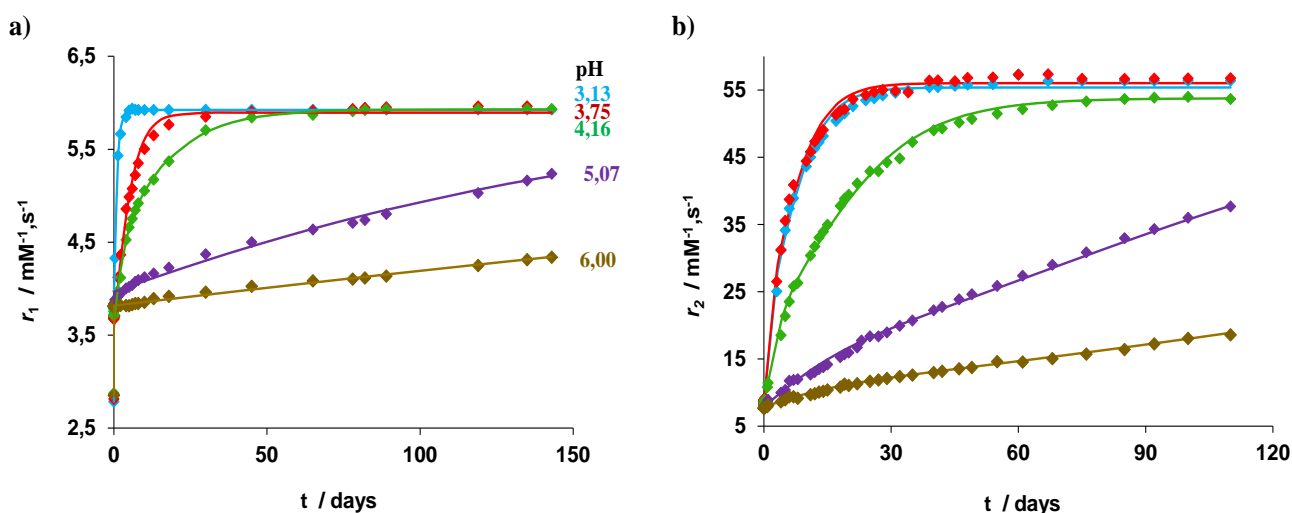


Figure 3.33 : Evolution de la relaxivité longitudinale ou transversale en fonction du temps. a) $[\text{Mn}(\text{L}^3)]^-$; b) $[\text{Mn}(\text{L}^6)]^-$. 60 MHz ; 37 °C. Les courbes représentent les ajustements.

Relation structure-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

Tableau 3.7 : Constantes de vitesse de dissociation (k_{obs}) et $t_{1/2} = \ln 2/k_{obs}$ des complexes étudiés.

Complexes	$k_{obs} / 10^{-6} \text{ (s}^{-1}) / t_{1/2}$	$k_{obs} / 10^{-6} \text{ (s}^{-1}) / t_{1/2}$	$k_{obs} / 10^{-6} \text{ (s}^{-1}) / t_{1/2}$	$k_{obs} / 10^{-6} \text{ (s}^{-1}) / t_{1/2}$
	(pH 3,1)	(pH 3,7)	(pH 4,1)	(pH 5,1)
$[\text{Mn}(\text{L}^3)]^-$	14,33(4) / 13,44 h	3,2(2) / 2,51 j	1,79(2) / 4,48 j	0,11(5) / 72,93 j
$[\text{Mn}(\text{L}^6)]^-$	2,26(3) / 3,55 j	2,06(2) / 3,89 j	0,86(1) / 9,32 j	0,17(2) / 47,19 j

L'introduction des groupements méthyle résulte en un renforcement de l'inertie, comme en témoignent les temps de demi-vie de dissociation considérablement plus longs à chaque pH pour $[\text{Mn}(\text{L}^6)]^-$ que pour $[\text{Mn}(\text{L}^3)]^-$ sauf à pH 5, qui peut être du fait de la constante de protonation plus élevée pour $[\text{Mn}(\text{L}^6)]^-$ ($\log K_{\text{MnHL}} = 4,52$) que pour $[\text{Mn}(\text{L}^3)]^-$ ($\log K_{\text{MnHL}} = 3,20$), même si le gain d'inertie ne représente pas plusieurs ordres de grandeur. L'encombrement stérique sur le carbone en alpha de la fonction carboxylate portant l'atome d'oxygène coordonné a donc un rôle important. Une conclusion similaire a été précédemment trouvée dans le cas des complexes macrocycliques des lanthanides. Le complexe d' Yb^{3+} formé avec le ligand HPDO3MA [acide (R,R,R,R)-10-(2-hydroxypropyl)- α,α',α'' -triméthyl-1,4,7,10-tetraazacyclo-dodecane-1,4,7-triacétique], qui porte un groupement méthyle sur chacun des trois acétates portés par le cyclène a été récemment étudié.²⁸ Son inertie est deux fois plus élevée que celle de son analogue hormis des substituants méthyle en position α,α',α'' qui était attribué à une meilleure préorganisation de la structure et une rigidification accrue du ligand grâce à l'encombrement stérique induit par les méthyles.

2.2.1.4. Conclusion sur les facteurs déterminants pour l'inertie

De l'ensemble de ces résultats, on peut tirer deux conclusions principales, illustrées par la figure 3.40 ci-dessous :

- Les complexes de Mn^{2+} basés sur des bispidines de conformation chaise-chaise et fonctionnalisées par un groupement coordinant en N7 et par un méthyle en N3 sont dotés d'une inertie exceptionnelle pour un complexe de Mn^{2+} hydraté.
- De petites modifications structurales qui touchent ces deux positions engendrent un impact fort sur l'inertie cinétique, comme en témoigne la comparaison entre les complexes $[Mn(L^3)]^-$ et $[Mn(HL^4)]$, isomères de position. La présence de la cavité bicyclique est primordiale pour obtenir une haute inertie, donc on peut en déduire que la taille de cette cavité est adéquate pour encapsuler le Mn^{2+} (on peut parler d'un «effet cryptand»). Néanmoins, pour les complexes $[Mn(HL^4)]$ et $[Mn(HL^5)]^-$, dénués de cavité bicyclique, l'inertie reste encore relativement bonne, en tous cas en comparaison à celle des complexes de Mn^{2+} que l'on retrouve dans la littérature. Par exemple dans les mêmes conditions (pH 6, 37 °C, 25/50 équ Zn^{2+}), les complexes $[Mn(HL^5)]^-$ et $[Mn(PyC3A)]^-$ ont respectivement un temps de demi-vie de 3,85 et 0,29 h²⁹.
- La présence de groupements encombrants en position α de la fonction carboxylate portant l'atome d'oxygène coordonné en position N7 renforce l'inertie.
- On note également une influence remarquable de l'amine de la chaîne lysine, en synergie avec celle des carboxylates dont l'oxygène est non-coordiné. Ceci peut être probablement mis en relation aussi avec les résultats des études structurales réalisées sur $[Mn(HL^1)]$ dans le chapitre 2. Le complexe $[Mn(HL^1)]$ reste de loin le plus inerte.

Relation structure-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

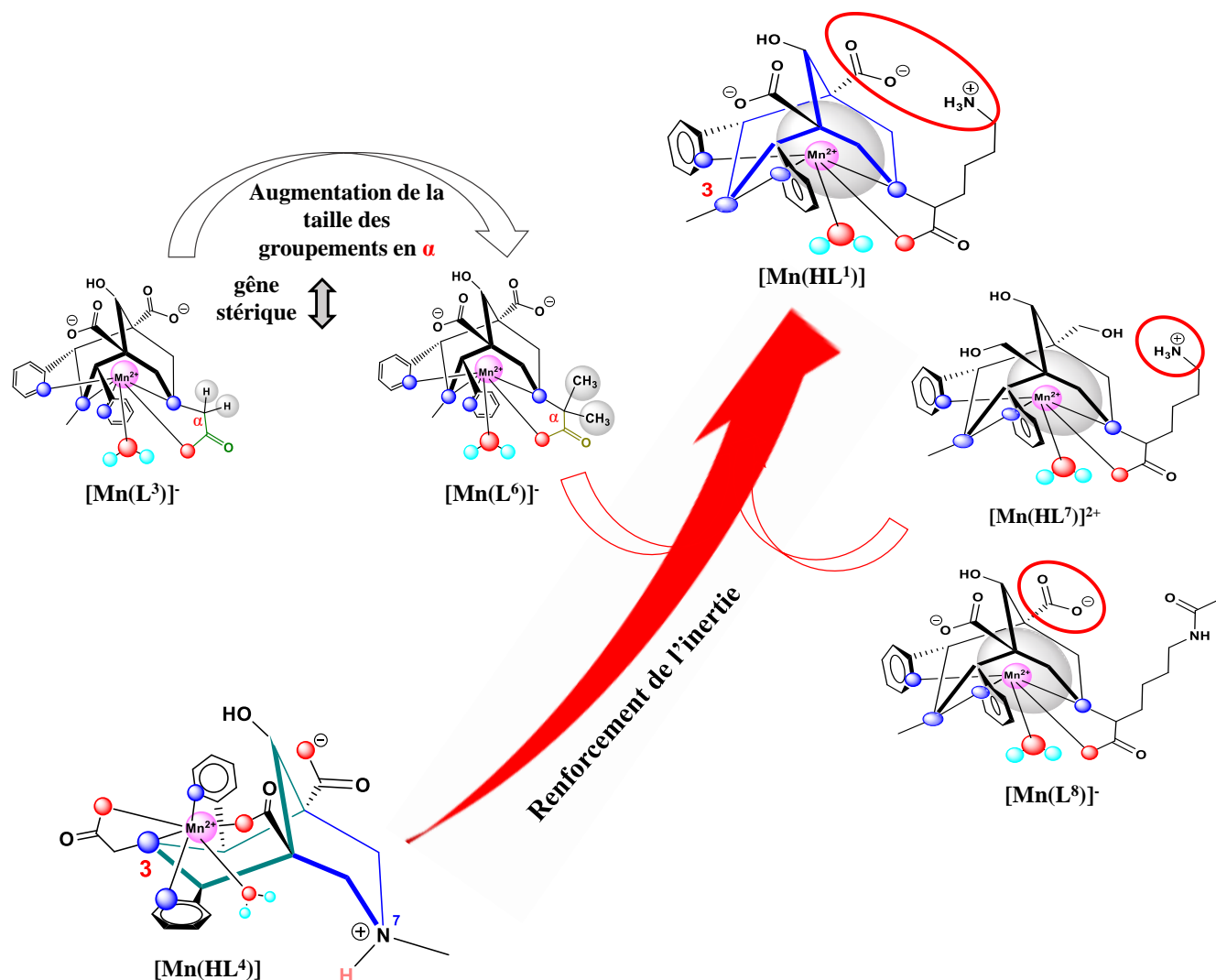


Figure 3.40 : Illustration des facteurs qui influent sur l'inertie cinétique des Mn(Bispidine) étudiés.

2.2.2. Influence de la nature et de la position des groupements fonctionnels sur les propriétés de relaxation des complexes Mn(L)

L'efficacité IRM et les différents paramètres qui la déterminent ont été déterminés et comparés pour les complexes $[Mn(HL^1)]$ (voir chapitre 2), $[Mn(L^2)]^{2-}$, $[Mn(L^3)]^-$, $[Mn(HL^7)]^{2+}$, ainsi que pour $[Mn(HL^4)]$ et $[Mn(HL^5)]^-$. Encore une fois, la situation de ces deux derniers est très différente et nous allons donc les présenter dans un deuxième temps, séparément des autres.

Chapitre 3

Les profils NMRD des complexes ont été enregistrés entre 0,5-80 MHz à deux températures, 25 °C et 37 °C (figure 3.41).

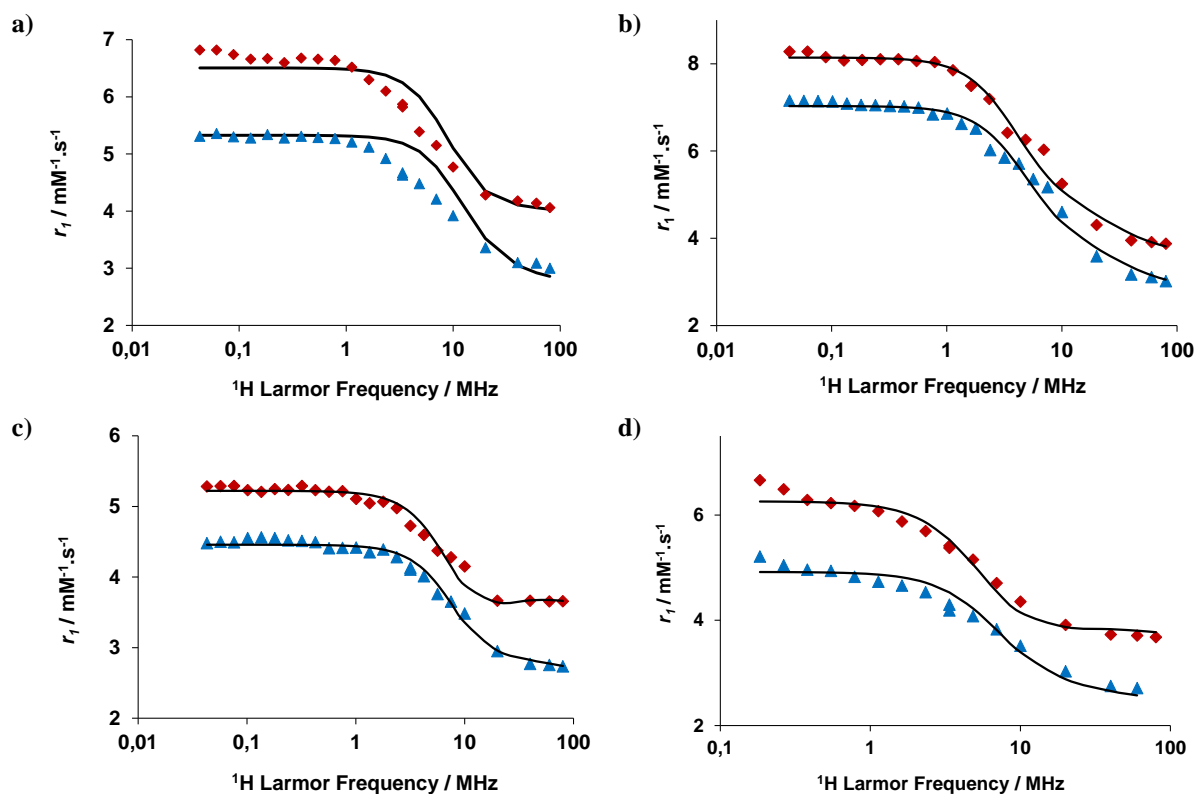


Figure 3.41 : Profils NMRD; \blacklozenge : 25°C ; \blacktriangle : 37°C. a) Complexe $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$; b) Complexe $[\text{Mn}(\text{L}^2)]^2$, ajustement réalisé en considérant la 2nd sphère de coordination ; c) Complexe $[\text{Mn}(\text{L}^3)]$; d) Complexe $[\text{Mn}(\text{HL}^7)]$. Les courbes représentent les ajustements.

Ces profils NMRD sont typiques des complexes de Mn^{2+} de faible poids moléculaire, pour lesquels la relaxivité est limitée par une rotation rapide. On observe une seule dispersion (1-10 MHz). Ces systèmes ont tous une bonne relaxivité pour un complexe de Mn^{2+} , comparable à celle des agents de contraste à base de gadolinium (Gd^{3+}) de petite taille³⁰ et ceci malgré les différences du spin électronique des deux cations métalliques.

Afin d'évaluer des facteurs qui gouvernent la relaxivité, en particulier les paramètres caractérisant l'état d'hydratation du complexe, l'échange d'eau et la rotation (q , k_{ex} , τ_{H}), qui sont étroitement liés à la structure moléculaire, nous avons réalisé des études RMN de ^{17}O à température variable et ces données ont été analysées ensemble avec les relaxivités. Les ajustements ont été faits *via* Matlab selon la théorie de Solomon-Bloembergen-Morgan pour décrire la relaxation paramagnétique en utilisant les équations décrites dans l'annexe.

Relation structure-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

La figure 3.42 représente l'évolution de la vitesse de relaxation transversale réduite de l' ^{17}O en fonction de l'inverse de la température.

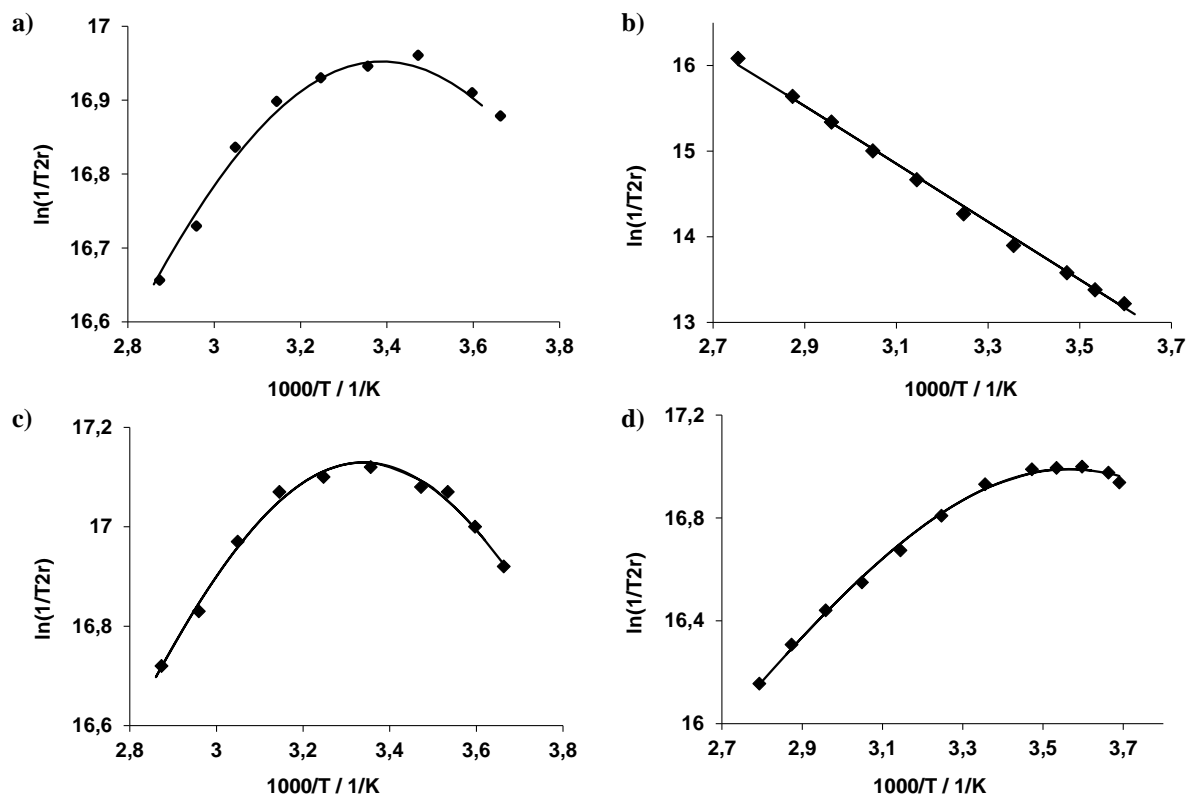


Figure 3.42 : Variation de la vitesse de relaxation transversale réduite de l' ^{17}O en fonction de l'inverse de la température. a) $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$; b) $[\text{Mn}(\text{L}^2)]^{2-}$; c) $[\text{Mn}(\text{L}^3)]$; d) $[\text{Mn}(\text{HL}^7)]^{2+}$. 400 MHz. Les courbes représentent les ajustements.

Dans un premier temps, ces données de RMN de ^{17}O ont été utilisées pour l'estimation de la valeur du nombre d'hydratation des complexes, q , selon la méthode de Gale et. al.³¹ Comme attendu avec des ligands penta-dentés et par analogie au $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ (chapitre 2), l'estimation donne des valeurs proches de 1. Néanmoins, la méthode n'est pas applicable dans le cas du $[\text{Mn}(\text{L}^2)]^{2-}$ car la courbe de $1/T_{2r}$ vs. $1/T$ ne présente pas de maximum ; en effet, dans toute la gamme de température, le système se trouve dans un régime d'échange lent. Pour la suite, nous avons supposé $q = 1$ pour $[\text{Mn}(\text{L}^2)]^{2-}$, en plein accord avec les relaxivités. On peut noter également que nous ne pouvons pas totalement exclure que le nombre d'hydratation soit légèrement diminué par rapport aux analogues acétate, comme $[\text{Mn}(\text{L}^3)]$, dû à un encombrement stérique plus important du groupement phosphonate, et que ce q légèrement diminué soit compensé par une contribution de la 2nd sphère plus importante à la relaxivité.

Chapitre 3

Néanmoins, même sans maximum observé, les valeurs absolues de $1/T_{2r}$ de ^{17}O montrent clairement que le nombre de molécule d'eau ne peut pas être très loin de 1.

Afin de calculer les paramètres microscopiques qui déterminent la relaxivité pour $[\text{Mn}(\text{L}^2)]$, $[\text{Mn}(\text{L}^3)]$ et $[\text{Mn}(\text{HL}^7)]^{2+}$, les valeurs de $1/T_{2r}$ de ^{17}O et les relaxivités ont été analysées ensemble. Dans l'ajustement, certains paramètres ont été fixés à des valeurs habituelles: la distance entre le cation métallique et le proton de la molécule d'eau en première sphère et dans la sphère externe, respectivement à $r_{\text{MnH}} = 2,83 \text{ \AA}$ et $a_{\text{MnH}} = 3,6 \text{ \AA}^3$, le coefficient de diffusion et son énergie d'activation à $D_{\text{MnH}} = 26 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et $E_{\text{MnH}} = 20 \text{ kJ mol}^{-1}$, et l'énergie d'activation pour la relaxation électronique à $E_v = 1 \text{ kJ mol}^{-1}$. Les paramètres suivants ont été calculés : la vitesse d'échange d'eau, k_{ex}^{298} , l'enthalpie et l'entropie d'activation de l'échange, ΔH^\ddagger et ΔS^\ddagger , le temps de corrélation rotationnelle, τ_{rH}^{298} , et son énergie d'activation E_R , les paramètres caractéristiques de la relaxation électronique, comme l'énergie de l'éclatement du champ, Δ^2 et le temps de corrélation pour la modulation du zero field splitting, τ_v^{298} , ainsi que la constante de couplage scalaire de ^{17}O , A/\hbar . Le nombre d'hydratation a été fixé à $q = 1$.

Vu que les relaxivités des complexes $[\text{Mn}(\text{L}^3)]^-$ et $[\text{Mn}(\text{HL}^7)]^{2+}$ sont plus basses que celles de $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$, nous avons décidé de ne pas considérer la contribution de la deuxième sphère dans l'analyse des courbes NMRD. Evidemment, on ne peut pas complètement exclure une telle contribution, mais elle semble moins importante que dans le cas de $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$. Cependant, pour $[\text{Mn}(\text{L}^2)]^{2-}$, avec la présence des oxygènes du phosphonate proche de la sphère de coordination, en plus des carboxylates, nous avons considéré la deuxième sphère dans l'analyse. Les paramètres obtenus dans l'ajustement sont représentés dans le tableau 3.8.

Relation structure-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

Tableau 3.8: Paramètres caractérisant l'échange d'eau et la relaxivité des complexes étudiés.

	[Mn(HL ¹)]	[Mn(L ²)] ²⁻	[Mn(L ³)] ⁻	[Mn(HL ⁷)] ²⁺
$r_1(\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}) / 60 \text{ MHz}/25^\circ\text{C}$	4,14	3,91	3,66	3,71
$k_{\text{ex}}^{298} / 10^7 (\text{s}^{-1})$	5,1(7)	0,12(1)	5,5(1)	7,4(2)
$\Delta H^\ddagger (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	10,6 (1)	25,71(7)	14,9 (4)	13,5 (4)
$\Delta S^\ddagger (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	-62	-42	-47	-49
$E_{\text{rH}} (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	22(1)	19(1)	20(1)	30(2)
$\tau_{\text{rH}}^{298} (\text{ps})$	100(5)	92(2)	89(2)	93(2)
$\tau_{\text{v}}^{298} (\text{ps})$	24(10)	22(1)	17(1)	18(2)
$\Delta^2 / 10^{-19} (\text{s}^{-2})$	0,8(1)	0,35(1)	1,64(9)	1,1(2)
$A_{\text{O}}/\hbar / 10^6 (\text{rad} \cdot \text{s}^{-2})$	28,0(1)	30(2)	33,2(2)	28,9(2)

On observe un échange d'eau lent pour [Mn(L²)]²⁻, le dérivé phosphonate. Plusieurs phénomènes peuvent être évoqués pour expliquer cette diminution d'un facteur de 50 du k_{ex} en comparaison au dérivé carboxylate [Mn(L³)]⁻. L'encombrement stérique ou encore la charge négative supplémentaire du phosphonate sont défavorables à l'arrivée de la molécule d'eau entrante dans un processus associatif. Mais on peut aussi imaginer une rétention de la molécule d'eau coordonnée grâce à la formation de liaisons hydrogène relativement fortes avec les oxygènes du phosphonate.

En revanche, pour les autres complexes dont l'atome donneur (O) appartient à un groupement carboxylate ([Mn(HL¹)], [Mn(L³)]⁻, [Mn(HL⁷)]²⁺), la constante de vitesse d'échange est comparable à celle des complexes de Mn²⁺ monohydratés,²⁹ sans différence notable entre les trois complexes. On peut ainsi dire que la disparition de la charge négative des carboxylates portés par les carbones C1 et C5 dans [Mn(HL¹)] n'a pas d'effet détectable sur la vitesse de

Chapitre 3

l'échange d'eau (comparaison $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ et $[\text{Mn}(\text{HL}^7)]^{2+}$). La raison est probablement la position de ces charges qui sont relativement loin du site de coordination de l'eau.

Dans l'analyse des relaxivités, un point intéressant concerne la contribution potentielle de la deuxième sphère à la relaxation pour les complexes qui portent des carboxylates en C1 et C5. Précédemment, nous avons jugé cette contribution importante pour $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ (chapitre 2) ; ici la comparaison avec $[\text{Mn}(\text{HL}^7)]^{2+}$ permet d'appréhender un peu plus directement ce point, même si dans une moindre mesure, les groupements hydroxyl peuvent aussi créer une deuxième sphère.

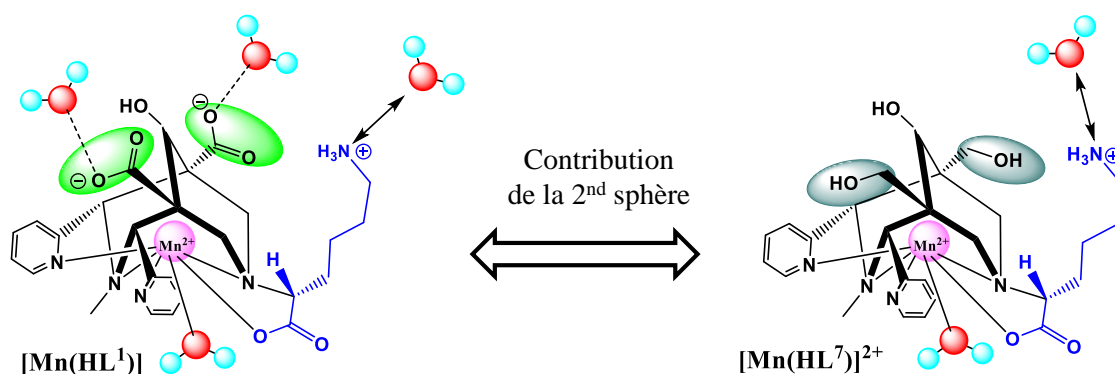


Figure 3.43 : Illustration de la contribution de la 2nd sphère de coordination à travers les carboxylates portés par C1 et C5.

L'augmentation de la relaxivité reste modérée ($\sim 10\%$) pour $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ par rapport à $[\text{Mn}(\text{HL}^7)]^{2+}$, ce qui indique que la présence et la charge des carboxylates a peu d'importance. On observe un gain de relaxivité quand on passe de la fonction acétate $[(\text{Mn}(\text{L}^3)]^-$ à la lysine $([\text{Mn}(\text{HL}^1)])$ (12%). Ceci implique une augmentation de la taille et donc du temps de corrélation rotationnelle, mais probablement la charge de l'amine de la lysine contribue aussi à augmenter l'effet du 2nd sphère en augmentant ainsi la relaxivité.

Les deux autres complexes qui sont monoprotonés sur l'amine du bicyclic et dont la conformation est bateau-chaise ($[\text{Mn}(\text{HL}^4)]$ et $[\text{Mn}(\text{HL}^5)]^-$) ont un comportement très différent. Les relaxivités sont plus basses (figure 3.44) que celles observées pour le groupe discuté plus haut, mais sans différence importante entre les deux complexes. Les vitesses de relaxation transversale de l' ^{17}O en fonction de la température (figure 3.45) indiquent la présence d'une demi molécule d'eau ($q = 0,5$) selon la méthode de Gale et al³¹ pour $[\text{Mn}(\text{HL}^4)]$, reflétant

Relation structure-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

l'équilibre entre un complexe monohydraté et un autre non hydraté. Pour $[\text{Mn}(\text{HL}^5)]^-$, les données sont peu concluantes car le maximum n'apparaît pas clairement dans la gamme de température accessible. Pour rappel, r_2 est linéairement proportionnel au q et une valeur maximale de $510 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ du r_2 correspond à $q = 1$.

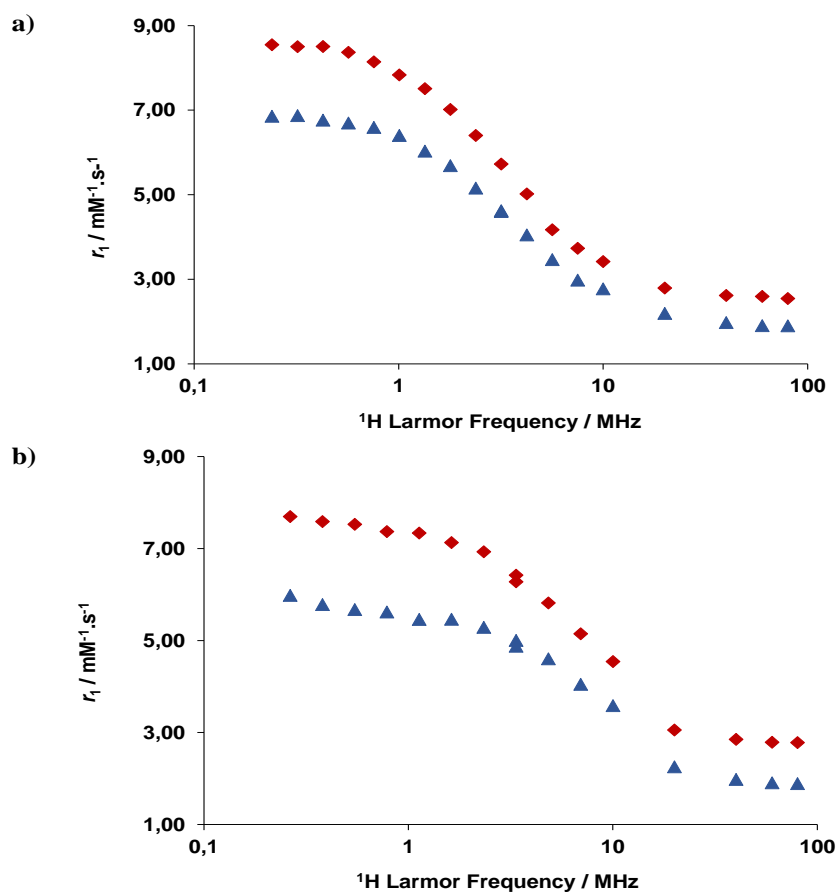


Figure 3.44 : Profils NMRD; \blacklozenge : 25 °C; \blacktriangle : 37 °C. a) $[\text{Mn}(\text{HL}^4)]$; b) $[\text{Mn}(\text{HL}^5)]^-$.

Chapitre 3

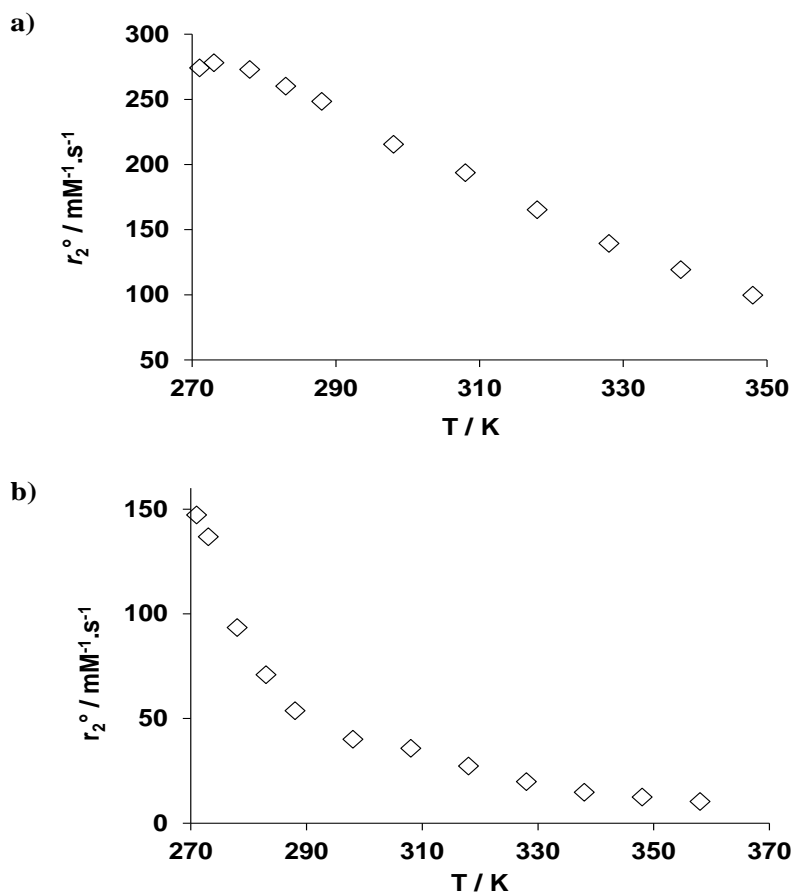


Figure 3.45 : Variation de la relaxivité transversale de l' ^{17}O en fonction de la température. a) $[\text{Mn}(\text{HL}^4)]$; b) $[\text{Mn}(\text{HL}^5)]$. 400 MHz.

Etant donné que $[\text{Mn}(\text{HL}^4)]$ présente un équilibre d'hydratation, le fit des données NMRD est très complexe car les vitesses de relaxation de ^1H sont le résultat des contributions des deux espèces dont la fraction molaire change en plus avec la température. Nous n'avons aucun moyen d'étudier la variation du q avec la température, et même en la connaissant, la séparation des contributions ne serait pas évidente. Par conséquent, aucun ajustement de ces données n'a été réalisé. Par ailleurs, en absence de l'information sûre concernant l'état d'hydratation du $[\text{Mn}(\text{HL}^5)]$, même une discussion sur la comparaison des relaxivités des deux complexes, qui sont très similaires, resterait aussi hypothétique.

Relation structure-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

En conclusion sur les relations structures – propriétés de relaxation des complexes, on peut souligner les points suivants :

- Les complexes $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$, $[\text{Mn}(\text{L}^2)]^{2-}$, $[\text{Mn}(\text{L}^3)]$ et $[\text{Mn}(\text{HL}^7)]^{2+}$ sont tous monohydratés et ont des relaxivités globalement similaires à celles des complexes de Gd^{3+} monohydratés, malgré la différence de spin entre Mn^{2+} et Gd^{3+} . La relaxivité de $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ reste la plus élevée, probablement grâce à une contribution forte de la deuxième sphère générée par la présence combinée des carboxylates portés par C1 et C5, et l'amine chargée.
- Le complexe formé avec le dérivé phosphonate a un échange d'eau plus lent que les autres. Sur tous les complexes $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$, $[\text{Mn}(\text{L}^2)]^{2-}$, $[\text{Mn}(\text{L}^3)]^-$ et $[\text{Mn}(\text{HL}^7)]^{2+}$, un mécanisme fortement associatif est suggéré par les entropies d'activation.
- Le comportement des complexes $[\text{Mn}(\text{HL}^4)]$ et $[\text{Mn}(\text{HL}^5)]^-$ est encore une fois très différent de celui des autres. Leur relaxivité est plus basse et ils possèdent moins d'une molécule d'eau en première sphère de coordination.

Chapitre 3

Conclusions

Les études réalisées dans ce chapitre nous ont permis de mettre en évidence le lien étroit entre les structures des bispidines étudiées et certaines propriétés physico-chimiques des complexes de Mn^{2+} qu'elles forment.

Dans un premier temps, les études potentiométriques et RMN sur les ligands ont révélé que la présence d'un groupement acétate en position N3 (L^4 et L^5) à la place d'un méthyle engendre une importante modification structurale, plus particulièrement sur la conformation du bicyclic. On observe le passage d'une conformation chaise-chaise à bateau-chaise, respectivement quand le méthyle est substitué par un acétate, qui sera aussi synonyme de perte de la « cavité bicyclique ».

Par la suite, les études physico-chimiques de leurs complexes de Mn^{2+} ont révélé le rôle primordial de cette « cavité bicyclique » et des fonctions portées par les cycles pipéridines dans la coordination du métal, affectant pratiquement toutes les propriétés des chélates.

On note une complexation (i) rapide pour L^4 et L^5 , de conformation bateau-chaise ; (ii) relativement lente pour L^2 et L^3 , de conformation chaise-chaise et dénuées de groupement encombrant en position α du site coordinant porté par l'azote N7 ; et (iii) lente pour L^1 , L^6 , L^7 , et L^8 , qui possèdent un groupement encombrant en position α .

Les études thermodynamiques montrent une augmentation modérée de la stabilité lors de la substitution de l'acétate par un groupement phosphonate en position N7 (L^1 vs. L^2), ainsi qu'au passage d'un ligand penta-denté à hexa-denté, comme en témoigne la comparaison entre L^4 et L^5 . En plus, ces derniers forment des complexes de Zn^{2+} plus stables, suggérant que la conformation bateau-chaise offre une cavité adaptée à la taille plutôt petite du Zn^{2+} .

Les études de l'inertie des complexes $[Mn(L)]$ ont également confirmé le rôle primordial de la cavité bicyclique, comme en témoignent de façon directe les complexes $[Mn(L^3)]^-$ et $[Mn(HL^4)]$, dont la comparaison des constantes de vitesse de dissociation révèle une différence de 3-4 ordres de grandeur, la décomplexation du $[Mn(L^3)]^-$ étant la plus lente.

Dans toute cette famille de complexes, $[Mn(HL^1)]$ reste le plus inerte. Cette résistance extraordinaire à la transmétallation au zinc est probablement liée à la présence combinée de l'amine primaire de la chaîne lysine et des carboxylates portés par le noyau bicyclique.

Relation structure-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

Ceci met alors en évidence le rôle non négligeable des fonctions chimiques, mise à part la « cavité bicyclique ».

La versatilité structurale observée chez les ligands de type bispidine se reflète aussi dans l'hydratation et les propriétés de relaxation de leur complexe de Mn^{2+} . Ceux qui portent un groupement méthyle en position N3 sont monohydratés. En raison de leur taille légèrement plus élevée que celle des agents de contraste commerciaux, leurs relaxivités sont globalement similaires, malgré la différence de spin entre Mn^{2+} et Gd^{3+} . La contribution de la seconde sphère de coordination est mise en évidence à travers $[Mn(HL^1)]$, conduisant à une relaxivité remarquablement élevée.

Les complexes $[Mn(HL^4)]$ et $[Mn(HL^5)]^-$, qui portent un acétate à la place du méthyle sur la position N3, possèdent moins d'une molécule en première sphère de coordination et par conséquent ont une relaxivité considérablement plus basse.

En résumé, l'ensemble de ces résultats constitue une belle démonstration de la versatilité des propriétés physico-chimiques des complexes de Mn^{2+} de type bispidine en fonction des différences structurales des ligands. L'optimisation de la structure permet alors de former des complexes de Mn^{2+} hautement inertes et efficaces en tant qu'agent de contraste potentiel pour l'IRM.

Cependant, leur stabilité thermodynamique reste plutôt modeste, et pour l'améliorer, dans le chapitre 4, nous avons étudié des complexes de Mn^{2+} basés sur des bispidines hepta- et octadentées.

Références

1. Procházková, S.; Kubíček, V.; Böhmová, Z.; Holá, K.; Kotek, J.; Hermann, P., DOTA analogues with a phosphinate-iminodiacetate pendant arm: modification of the complex formation rate with a strongly chelating pendant. *Dalton Transactions* **2017**, 46 (31), 10484-10497.
2. Grenier, L.; Beyler, M.; Platas-Iglesias, C.; Closson, T.; Gómez, D. E.; Seferos, D. S.; Liu, P.; Ornatsky, O. I.; Baranov, V.; Tripier, R., Highly Stable and Inert Complexation of Indium(III) by Reinforced Cyclam Dipicolinate and a Bifunctional Derivative for Bead Encoding in Mass Cytometry. *Chemistry – A European Journal* **2019**, 25 (67), 15387-15400.
3. Huh, D. N.; Ciccone, S. R.; Bekoe, S.; Roy, S.; Ziller, J. W.; Furche, F.; Evans, W. J., Synthesis of LnII-in-Cryptand Complexes by Chemical Reduction of LnIII-in-Cryptand Precursors: Isolation of a NdII-in-Cryptand Complex. *Angewandte Chemie International Edition* **2020**, 59 (37), 16141-16146.
4. Löw, H.; Mena-Osteritz, E.; Mullen, K. M.; Jäger, C. M.; von Delius, M., Self-Assembly, Adaptive Response, and in,out-Stereoisomerism of Large Orthoformate Cryptands. *ChemPlusChem* **2020**, 85 (5), 1008-1012.
5. Legdali, T.; Roux, A.; Platas-Iglesias, C.; Camerel, F.; Nonat, A. M.; Charbonnière, L. J., Substitution-Assisted Stereochemical Control of Bispidine-Based Ligands. *The Journal of Organic Chemistry* **2012**, 77 (24), 11167-11176.
6. Norrehed, S.; Erdélyi, M.; Light, M. E.; Gogoll, A., Protonation-triggered conformational modulation of an N,N'-dialkylbispidine: first observation of the elusive boat–boat conformer. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2013**, 11 (37), 6292-6299.
7. Haridas, V.; Sadanandan, S.; Sharma, Y. K.; Chinthalapalli, S.; Shandilya, A., Bispidine as a secondary structure nucleator in peptides. *Tetrahedron Letters* **2012**, 53 (6), 623-626.
8. Hilton, B. D.; Chmurny, G. N.; Muschik, G. M., Taxol: Quantitative Internuclear Proton-Proton Distances in CDCl₃ Solution from nOe Data: 2D NMR Roesy Buildup Rates at 500 MHz. *Journal of Natural Products* **1992**, 55 (8), 1157-1161.
9. Baranac-Stojanović, M.; Stojanović, M., Magnetic Anisotropy of the C–C Single Bond. *Chemistry – A European Journal* **2013**, 19 (13), 4249-4254.
10. Roques, B. P.; Prange, T.; Oberlin, R., Etude par RMN 1H des effets de solvant sur les déplacements chimiques et les couplages vicinaux des benzothiényopyridines. *Organic Magnetic Resonance* **1977**, 9 (4), 185-192.
11. Basso, E. A.; Abiko, L. A.; Gauze, G. F.; Pontes, R. M., Conformational Analysis of cis-2-Halocyclohexanols; Solvent Effects by NMR and Theoretical Calculations. *The Journal of Organic Chemistry* **2011**, 76 (1), 145-153.
12. Andrei V. Afonin, A. V. V., Igor A. Ushakov, Nadezhda V. Zorina, Elena Yu. Schmidt, Comparative analysis of hydrogen bonding with participation of the nitrogen, oxygen and sulfur atoms in the 2(2'-heteroaryl)pyrroles and their trifluoroacetyl derivatives based on the 1H, 13C, 15N spectroscopy and DFT calculations. *Magnetic Resonance Chemistry* **2008**, 46, 441-447.
13. Andrei V. Afonin, I. A. U., Alexander V. Vashchenko, Dmitry E. Simonenko, Andrei V. Ivanov, Alexander M. Vasil'tsov, Al'bina I. Mikhaleva, Boris A. Trofimov, C–H···N and C–H···O intramolecular hydrogen bonding effects in the 1H, 13C and 15N NMR spectra of the configurational isomers of 1-vinylpyrrole-2-carbaldehyde oximes substantiated by DFT calculations. *Resonance Magnetic Chemistry* **2009**, 47, 105-112.
14. Aime, S.; Botta, M.; Garda, Z.; Kucera, B. E.; Tircso, G.; Young, V. G.; Woods, M., Properties, Solution State Behavior, and Crystal Structures of Chelates of DOTMA. *Inorganic Chemistry* **2011**, 50 (17), 7955-7965.

Relation structure-propriétés physico-chimiques des complexes Mn(Bispidine)

15. Brücher, E.; Laurency, G.; Makra, Z. S., Studies on the kinetics of formation and dissociation of the cerium(III)-DOTA complex. *Inorganica Chimica Acta* **1987**, *139* (1), 141-142.
16. Wang, X.; Jin, T.; Comblin, V.; Lopez-Mut, A.; Merciny, E.; Desreux, J. F., A kinetic investigation of the lanthanide DOTA chelates. Stability and rates of formation and of dissociation of a macrocyclic gadolinium(III) polyaza polycarboxylic MRI contrast agent. *Inorganic Chemistry* **1992**, *31* (6), 1095-1099.
17. Balogh, E.; Tripier, R.; Ruloff, R.; Tóth, É., Kinetics of formation and dissociation of lanthanide(III) complexes with the 13-membered macrocyclic ligand TRITA4⁻. *Dalton Transactions* **2005**, (6), 1058-1065.
18. Tóth, É.; Brücher, E., Stability constants of the lanthanide(III)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetate complexes. *Inorganica Chimica Acta* **1994**, *221* (1), 165-167.
19. Szilágyi, E.; Tóth, É.; Kovács, Z.; Platzek, J.; Radüchel, B.; Brücher, E., Equilibria and formation kinetics of some cyclen derivative complexes of lanthanides. *Inorganica Chimica Acta* **2000**, *298* (2), 226-234.
20. Toth, E.; Brucher, E.; Lazar, I.; Toth, I., Kinetics of Formation and Dissociation of Lanthanide(III)-DOTA Complexes. *Inorganic Chemistry* **1994**, *33* (18), 4070-4076.
21. Bianchi, A.; Calabi, L.; Giorgi, C.; Losi, P.; Mariani, P.; Palano, D.; Paoli, P.; Rossi, P.; Valtancoli, B., Thermodynamic and structural aspects of manganese(II) complexes with polyaminopolycarboxylic ligands based upon 1,4,7,10-tetraazacyclododecane (cyclen). Crystal structure of dimeric [MnL]₂·2CH₃OH containing the new ligand 1,4,7,10-tetraaza-cyclododecane-1,4-diacetate. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **2001**, 917-922.
22. Garda, Z.; Forgacs, A.; Do, Q. N.; Kalman, F. K.; Timari, S.; Baranyai, Z.; Tei, L.; Toth, I.; Kovacs, Z.; Tircso, G., Physico-chemical properties of Mn(II) complexes formed with cis- and trans-DO2A: thermodynamic, electrochemical and kinetic studies. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2016**, *163*, 206-213.
23. Burai, L.; Ren, J.; Kovacs, Z.; Brücher, E.; Sherry, A. D., Synthesis, Potentiometry, and NMR Studies of Two New 1,7-Disubstituted Tetraazacyclododecanes and Their Complexes Formed with Lanthanide, Alkaline Earth Metal, Mn²⁺, and Zn²⁺ Ions. *Inorganic Chemistry* **1998**, *37* (1), 69-75.
24. A. D. Sherry, P. C., R. E. Lenkinski, Primer on Gadolinium Chemistry. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* **2009**, *30*, 1240-1248.
25. Botár, R.; Molnár, E.; Trencsényi, G.; Kiss, J.; Kálmán, F. K.; Tircsó, G., Stable and Inert Mn(II)-Based and pH-Responsive Contrast Agents. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (4), 1662-1666.
26. E. Brücher, G. T., Z. Baranyai, Z. Kovacs, and A.D. Sherry, *Stability and Toxicity of Contrast Agents*. eds. A.E. Merbach, L. Helm et E. Toth; 2nd edition ed.; The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging 2013.
27. Kalman, F. K.; Tircso, G., Kinetic Inertness of the Mn²⁺ Complexes Formed with AAZTA and Some Open-Chain EDTA Derivatives. *Inorganic Chemistry* **2012**, *51* (19), 10065-10067.
28. Ferrauto, G.; Delli Castelli, D.; Leone, L.; Botta, M.; Aime, S.; Baranyai, Z.; Tei, L., Modifying LnHPDO3A Chelates for Improved T1 and CEST MRI Applications. *Chemistry – A European Journal* **2019**, *25* (16), 4184-4193.
29. Gale, E. M.; Atanasova, I. P.; Blasi, F.; Ay, I.; Caravan, P., A Manganese Alternative to Gadolinium for MRI Contrast. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (49), 15548-15557.
30. Berki, T. R.; Martinelli, J.; Tei, L.; Willcock, H.; Butler, S. J., Polymerizable Gd(III) building blocks for the synthesis of high relaxivity macromolecular MRI contrast agents. *Chemical Science* **2021**, *12* (11), 3999-4013.

Chapitre 3

31. Gale, E. M.; Zhu, J.; Caravan, P., Direct Measurement of the Mn(II) Hydration State in Metal Complexes and Metalloproteins through O-17 NMR Line Widths. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (49), 18600-18608.
32. Rolla, G. A.; Platas-Iglesias, C.; Botta, M.; Tei, L.; Helm, L., H-1 and O-17 NMR Relaxometric and Computational Study on Macrocyclic Mn(II) Complexes. *Inorganic Chemistry* **2013**, *52* (6), 3268-3279.

*Chapitre 4 : Etude de ligands de type
bispidine sélectifs au Mn(II) vs. le Zn(II)*

Introduction

Jusqu'ici, les études réalisées dans cette thèse sur des bispidines penta-dentées ont révélé une inertie exceptionnelle et une bonne efficacité des complexes de Mn^{2+} . Cependant, un point faible de ces complexes reste leur stabilité modeste. En plus, elles forment des complexes de Zn^{2+} plus stables que ceux à base de Mn^{2+} , prédit par la série d'Irving-Williams.¹

Dans ce contexte, en collaboration avec l'équipe du Pr. Peter Comba de l'Université d'Heidelberg, en Allemagne, nous avons étudié des complexes de Mn^{2+} basés sur des bispidines hepta- et octa-dentées (figure 4.1).

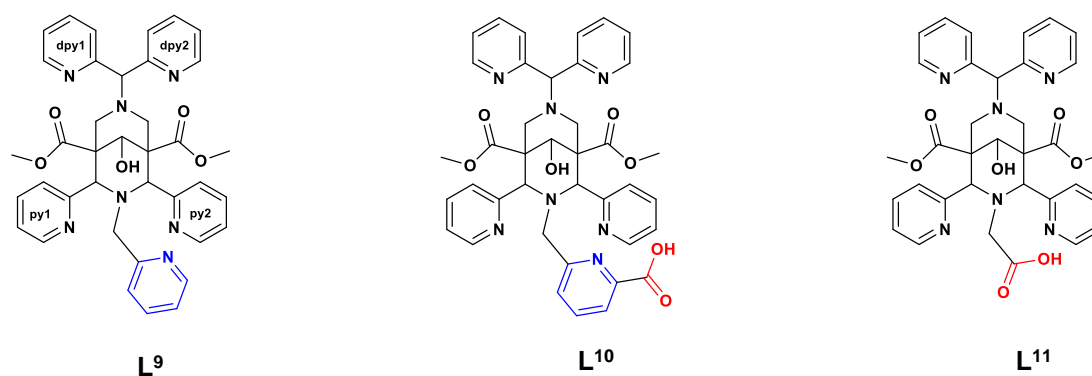


Figure 4.1 : Structures des bispidines étudiées.

D'une part, l'augmentation de la denticité du ligand pourrait conduire à une stabilité plus élevée. D'autre part, la présence d'une cavité de coordination toujours rigide et plus grande due au nombre plus élevé de sites coordinants sur le ligand pourrait potentiellement engendrer une sélectivité au Mn^{2+} vis-à-vis du Zn^{2+} qui a un rayon ionique plus petit ($r_{Mn^{2+}}$ est approximativement 10 % plus élevé que $r_{Zn^{2+}}$, en fonction du nombre de coordination).

Contrairement aux bispidines penta- et hexa-dentées, décrites précédemment, qui ne présentent pas de discrimination entre le Mn^{2+} et le Zn^{2+} , les bispidines hepta- ou octa-dentées étudiées dans ce chapitre pourraient privilégier le cation métallique plus gros et ainsi inverser l'ordre de stabilité prédit par la série d'Irving-Williams.¹ Concevoir des ligands sélectifs au Mn^{2+} vs. le Zn^{2+} représente un défi majeur ; en effet, la base de données des constantes de stabilité de l'IUPAC ne contient que quelques exemples de ligands sélectifs au Mn^{2+} par rapport au Zn^{2+} avec des différences de $\log K$ qui sont toutes inférieures à 1.²

Chapitre 4

Il est important de noter que la présence d'une cavité bicyclique grande et rigide due à l'augmentation du nombre de site de coordination est connue pour favoriser la complexation des ions métalliques de grande taille.³⁻⁶ En effet, avec les ions de petite taille, certains sites ne sont pas coordonnés pour des raisons stériques, par rapport à un ion de plus grande taille, or le nombre de coordinant autour de l'ion influe significativement sur la stabilité.

Les trois bispidines étudiés dans ce chapitre diffèrent par la nature du groupement en position N3. Les bispidines L⁹ et L¹¹ offrent sept sites de coordination. Idéalement, ils peuvent être tous accueillis dans la sphère de coordination du Mn²⁺ pour former un complexe très stable, mais pas autour du Zn²⁺, cation de plus petite taille. La substitution du groupement pyridyle de la bispidine L⁹ par un picolinate (L¹⁰) nous permettra d'étudier directement l'influence du renforcement de la denticité du ligand (de 7 à 8) sur la stabilité, en espérant que le nombre de coordination du Mn²⁺ peut monter jusqu'à 8. Avec des ligands plus flexibles et plus « conventionnels », le Mn²⁺ forme des complexes typiquement hexa- ou hepta-coordinés en solution, et en effet, la plupart des systèmes reportés dans la littérature dans le contexte de l'IRM sont des complexes monohydratés avec un nombre de coordination de NC = 7.⁷ Néanmoins, quelques complexes de Mn²⁺ ont été également décrits avec un NC = 8.⁸⁻¹² Quant au ligand L¹¹, sa comparaison avec la L⁹ sera intéressante afin de comprendre le rôle de la nature de l'atome donneur sur la stabilité et la sélectivité entre le Mn²⁺ et le Zn²⁺.

La synthèse des ligands a été réalisée au sein de l'équipe du Prof. Peter Comba à Heidelberg, et comme précédemment, nous avons mené toutes les études physico-chimiques. Tout d'abord, les constantes de stabilité des complexes de Mn²⁺ et de Zn²⁺ ont été déterminées. A l'issue de l'étude thermodynamique, nous avons caractérisé l'inertie des complexes de Mn²⁺ pour voir l'impact de l'augmentation de la denticité. Comme les ligands L⁹ et L¹¹ forment des complexes de Mn²⁺ monohydratés, leurs propriétés de relaxation sont également intéressantes et ont été donc caractérisées.

Enfin, avec le complexe [Mn(L¹¹)]⁺ nous avons aussi réalisé une étude pharmacocinétique *in vivo* chez des souris saines par IRM, et la biodistribution *ex vivo* du complexe a été déterminée par des mesures ICP-MS.

1. Synthèse, Complexation et stabilité thermodynamique des M(L)

1.1. Synthèse des ligands

Le schéma d'hémisynthèse à partir de précurseurs de type bispidine décrits dans la littérature¹³⁻¹⁵ et le chlorure de di-(2-pyridyl)-méthyle est représenté par la figure 4.2.

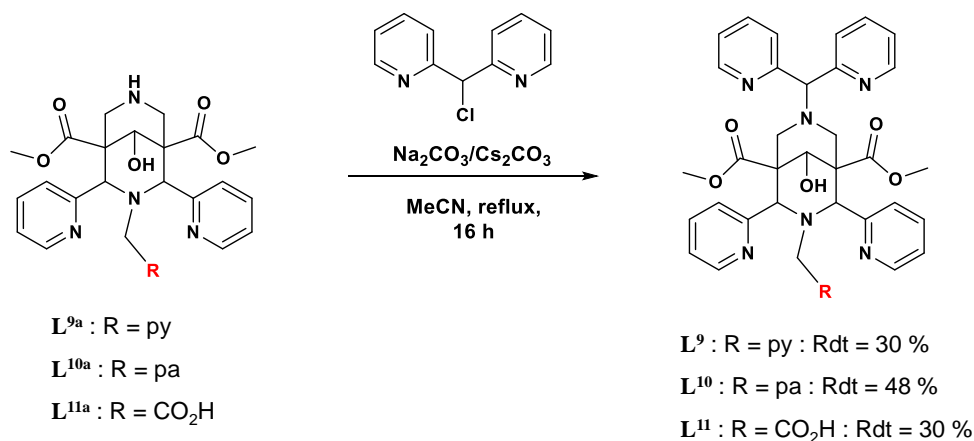


Figure 4.2 : Schéma d'hémisynthèse des bispidines étudiées.

Les ligands sont obtenus suite à une substitution nucléophile entre l'amine secondaire nucléophile des précurseurs L^{9a} , L^{10a} et L^{11a} et le chlorure de di-(2-pyridyl)-méthyle en présence d'une base pour la déprotonation de l'intermédiaire formé ($[\text{L}^{9/10/11a}\text{-NH-di-(2-pyridyl)-méthyle}]^+$).

Dans le cas du ligand L^9 , la réaction est catalysée par de l'iodure de sodium (NaI) pour former un intermédiaire iodé, plus réactif que son analogue chloré, car l'iodure est beaucoup plus nucléofuge que le chlorure.

Les spectres RMN ^1H des ligands sont représentés par la figure 4.3.

Chapitre 4

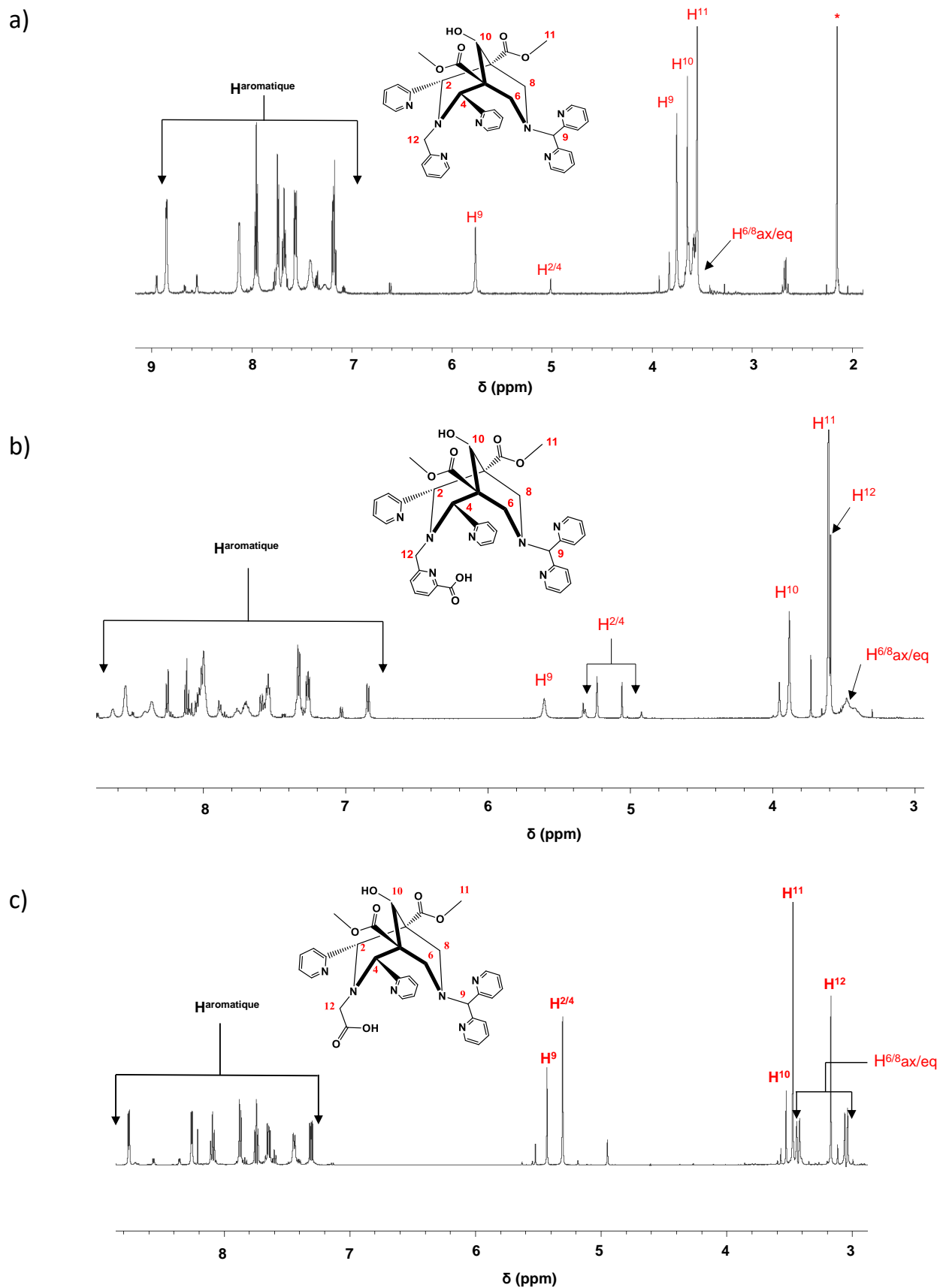


Figure 4.3 : Spectres RMN ^1H des bispidines étudiées dans du D_2O . 600 MHz, 25 °C. a) L^9 ; b) L^{10} et c) L^{11} .

1.2. Complexation

Dans l'objectif de définir les conditions idéales de complexation et de titrage pour la détermination des constantes de stabilité, nous avons suivi la complexation de ces bispidines avec le Mn^{2+} et le Zn^{2+} . La complexation du Cu^{2+} avec la L^9 a aussi été étudiée. A noter que le Cu^{2+} est le troisième métal de transition le plus abondant dans l'organisme, après le Fe^{2+} et le Zn^{2+} .¹⁶ Cependant, par rapport au Cu^{2+} , la concentration physiologique du Zn^{2+} est beaucoup plus importante dans des fluides biologiques.

La complexation a été suivie dans des échantillons composés d'un mélange équimolaire du ligand et du métal correspondant, tamponné à un pH donné. Nous avons réalisé cette étude entre pH 2 et 6 et la réaction est suivie par spectroscopie UV-visible, en observant l'évolution de la bande d'absorption des pyridines. La figure 4.4 représente les spectres d'absorption en fonction du temps de la complexation de L^9 avec le Mn^{2+} (pH 3 et 6), le Zn^{2+} et le Cu^{2+} (pH 3).

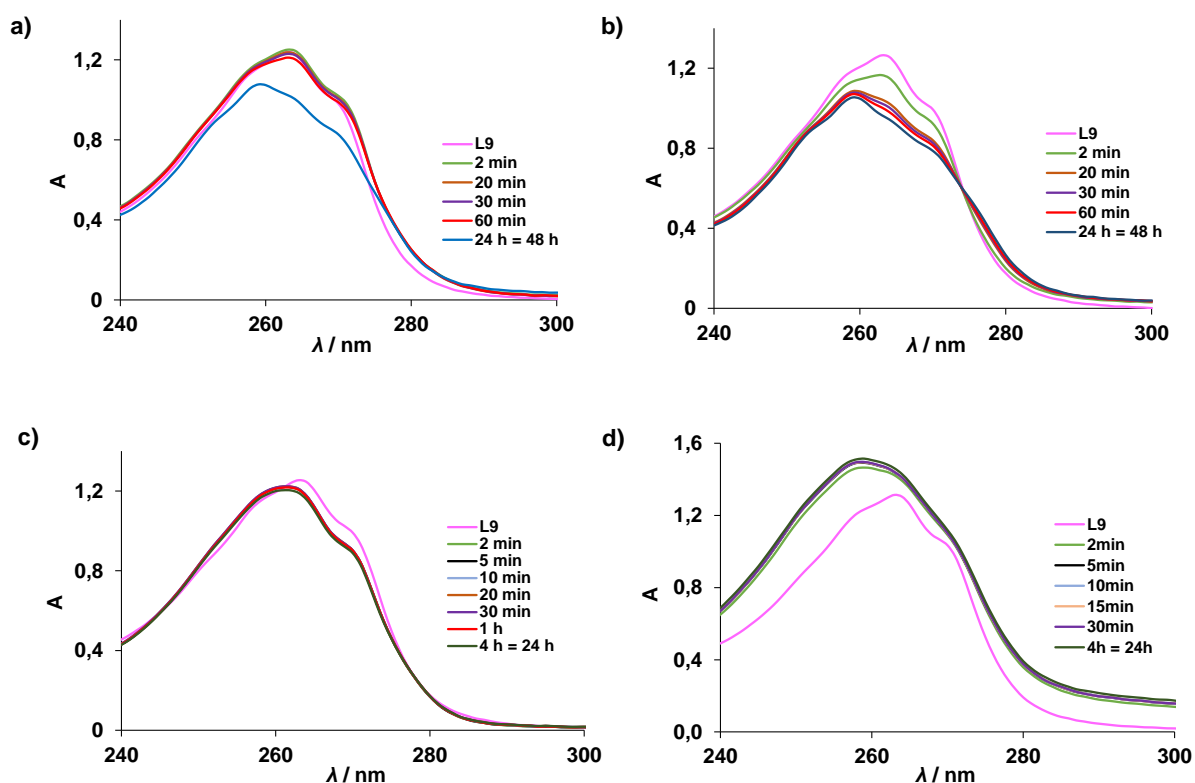


Figure 4.4 : a) $L^9 + 1 \text{ equ } Mn^{2+}$, pH 3. b) $L^9 + 1 \text{ equ } Mn^{2+}$, pH 6. c) $L^9 + 1 \text{ equ } Zn^{2+}$, pH 3. d) $L^9 + 1 \text{ equ } Cu^{2+}$, pH 3. $C_{L^9} = c_M = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$; 25°C ; $I = 0,15 \text{ M NaCl}$.

Chapitre 4

Nous observons une complexation rapide avec le Zn^{2+} , complète en moins de cinq minutes à pH 3. En revanche, avec le Mn^{2+} , la complexation est lente même à pH 6, comme nous l'avons observé lors des études de complexation des bispidines penta-dentées (Chapitre 3). La formation du complexe est caractérisée par une évolution hypochrome de la bande d'absorption, accompagnée d'un déplacement hypochrome.

Avec le Cu^{2+} , la complexation est moins rapide, mais elle est complète au-delà de cinq minutes à pH 3.

À noter qu'avec les deux autres bispidines (L^{10} et L^{11}) nous avons eu les mêmes évolutions avec une temporalité similaire.

Pour toute utilisation lors des études de caractérisation et *in vivo*, les complexes $Mn(L^{9-11})$ sont préparés en mélangeant des quantités équimolaires de Mn^{2+} et du ligand correspondant, à pH 7, 65 °C, pendant 30 min. Le pH est régulièrement contrôlé et ajusté par l'addition d'une solution de base (NaOH).

Lors des études de stabilité par potentiométrie, nous avons réalisé des batchs pour les complexes de Mn^{2+} ou de Cu^{2+} entre pH 2,5 et 7 ; alors que pour le Zn^{2+} , nous avons procédé à un titrage direct, avec le temps approprié pour atteindre l'équilibre (~ 5 min).

1.3. Stabilité des $[M(L^{9-11})]$

Dans un premier temps, nous avons réalisé un titrage potentiométrique des ligands entre pH 2 et 12 (figure 4.5), nécessaire au calcul de leurs constantes de protonation. Pour L^9 , le titrage est arrêté à pH 9, car au-delà de ce pH, le ligand commence à précipiter.

Pour les systèmes Mn/L^9 , Mn/L^{11} , Cu/L^9 et Zn/L^{9-11} , nous avons pu déterminer les constantes de stabilité par potentiométrie en réalisant des titrages directs (Zn^{2+}) ou en échantillons individuels (batchs : Mn^{2+} et Cu^{2+}) avec des temps d'attente pour atteindre l'équilibre entre 6 et 75 h, en fonction du pH et du ligand. Dans certains cas, nous avons débuté les titrages à partir du pH 1,8 (Zn/L^{10} , Zn/L^{11} , Cu/L^9). Toutes les courbes de titrage sont représentées sur la figure 4.5.a-b.

Dans le cas du système Mn/L^9 , un titrage direct a pu également être réalisé avec un temps d'attente de 3 min (figure 4.5-a). La courbe ainsi obtenue est parfaitement reproductible. Elle est évidemment très différente de celle constituée des points mesurés dans les batchs qui correspondent au vrai état d'équilibre. Cette courbe correspond à la formation d'un pré-

Etude de ligands de type bispidine sélectifs au Mn(II) vs. le Zn(II)

complexe, $[\text{Mn}(\text{HL}^9)^*]^{3+}$, une sorte d'intermédiaire relativement stable au cours de la formation du complexe $[\text{Mn}(\text{L}^9)]$. Il s'agit très probablement d'une espèce dans laquelle le Mn^{2+} est encore en dehors « de la cavité bicyclique » et l'amine tertiaire du bicycle reste protonée à pH 7. L'analyse de cette courbe de titrage permet de calculer une constante de stabilité pour cette espèce, $\log K_{[\text{Mn}(\text{HL}^9)^*]^{3+}} = 6,50(5)$, ainsi que trois constantes de protonation dont la première correspond certainement à la déprotonation de l'amine tertiaire du bicycle : $\log K_{[\text{Mn}(\text{HL}^9)^*]^{3+}} = 9,10(4)$; $\log K_{[\text{Mn}(\text{H}_2\text{L}^9)^*]^{3+}} = 5,98(3)$, $\log K_{[\text{Mn}(\text{H}_3\text{L}^9)^*]^{3+}} = 3,61(5)$. L'intermédiaire est de 16 ordres de grandeur moins stable que le complexe obtenu après 48 h, $[\text{Mn}(\text{L}^9)]^{2+}$ (voir plus bas). On peut supposer que l'étape de déprotonation de l'intermédiaire constitue l'étape cinétique déterminante, comme nous l'avons observé lors des études de complexation des bispidines penta-dentées portant des groupements encombrants (Chapitre 3). Il est intéressant de noter que la constante de stabilité de l'intermédiaire a pu être déterminée de la même façon, par titrage potentiométrique direct, dans le cas de la formation du $[\text{Gd}(\text{DOTA})]^-$; dans ce cas-là il s'agit d'un intermédiaire qui est diprotoné sur les deux azotes du macrocycle.¹⁷

En contraste à $[\text{Mn}(\text{L}^9)]^{2+}$ et $[\text{Mn}(\text{L}^{11})]^+$, le complexe $[\text{Mn}(\text{L}^{10})]^+$ est trop stable, et il est déjà complètement formé à pH 1. Par conséquent, son $\log K_{[\text{Mn}(\text{L}^{10})]^+}$ n'a pas pu être déterminé par potentiométrie. Afin d'accéder à cette constante de stabilité, nous avons réalisé un titrage relaxométrique dans des échantillons batchs avec des temps d'attente pour atteindre l'équilibre appropriés (figure 4.5-d). Lors de cette expérience, nous avons suivi la variation de la relaxivité transversale ou longitudinale en fonction du pH dans des échantillons qui contiennent des quantités équimolaires de ligand et de Mn^{2+} . A chaque pH, le temps de relaxation paramagnétique mesuré est la somme des contributions des différentes espèces paramagnétiques, c'est-à-dire le complexe $[\text{Mn}(\text{L})]$, le complexe protoné $[\text{Mn}(\text{HL})]$ (s'il y en a) et le métal non-complexé (Mn^{2+}). En connaissant les concentrations totales du ligand et du métal ainsi que les constantes de protonation du ligand, il devient possible de calculer les constantes de stabilité et de protonation du complexe. Par ailleurs, afin de valider cette méthode relaxométrique que nous avons mise en place pour la première fois pour la détermination du $\log K$ d'un complexe de Mn^{2+} , un titrage relaxométrique a été également réalisé et les données ont été analysées pour Mn/L^9 .

Chapitre 4

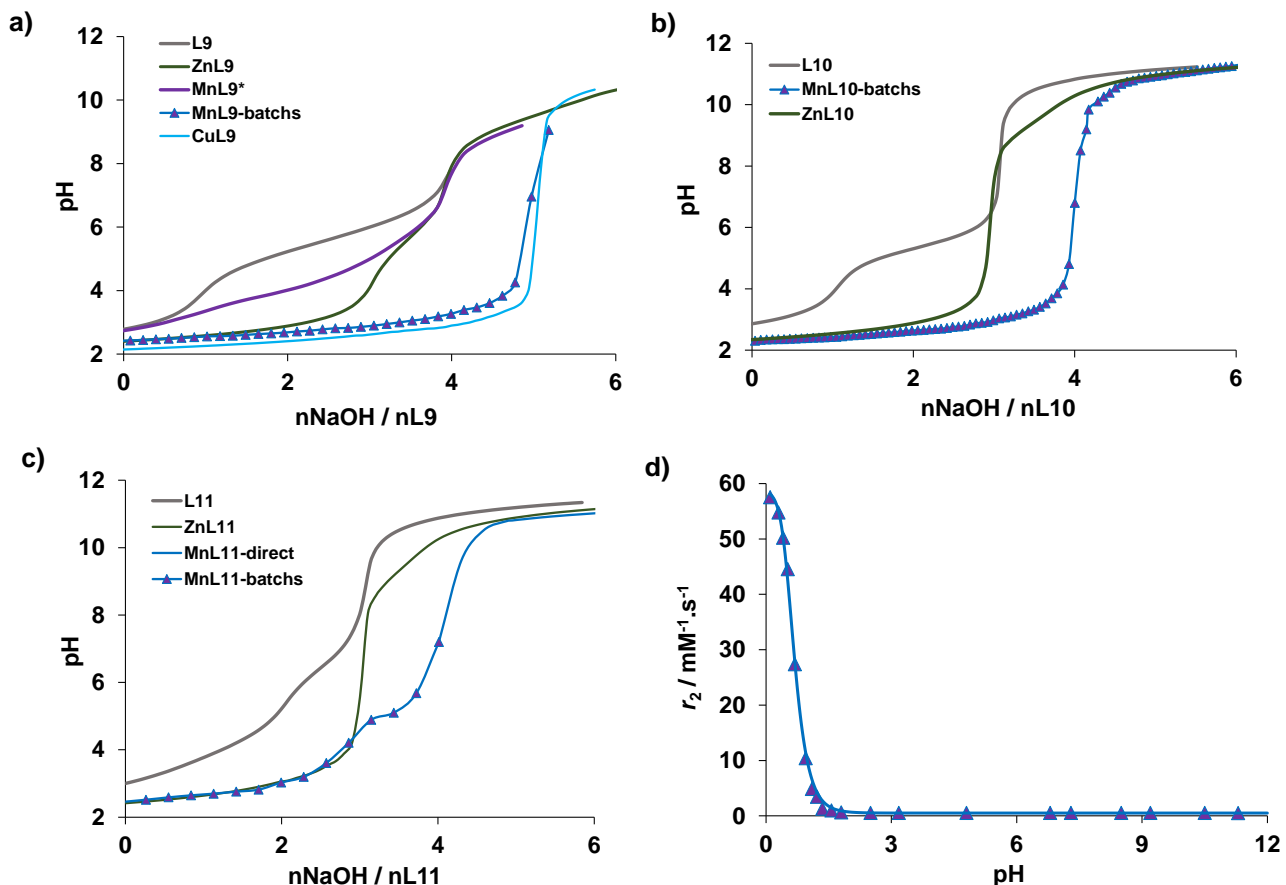


Figure 4.5 : a-c) Courbes de titrage potentiométrique des ligands en absence et en présence des métaux ; d) Courbe de titrage relaxométrique du complexe $[Mn(L^{10})]^+$. $c_L = c_M = 2 \times 10^{-3} M$; $298 K$; $I = 0,15 M NaCl$.

Les constantes de stabilité sont calculées en utilisant le logiciel Hyperquad 2008 pour les titrages potentiométriques, et Matlab pour les titrages relaxométriques. Les ajustements des titrages relaxométriques sont illustrés sur la figure 4.6. Cette figure représente aussi la distribution des espèces pour les systèmes Mn/L⁹⁻¹¹, calculée à partir des constantes de stabilité déterminées, ainsi que l'évolution de la relaxivité des échantillons en fonction du pH.

Tous les résultats sont représentés dans le tableau 4.1 ci-après.

Etude de ligands de type bispidine sélectifs au Mn(II) vs. le Zn(II)

Tableau 4.1 : Constantes de protonation des ligands et constantes de protonation et de stabilité des complexes.

	L ⁹	L ¹⁰	L ¹¹	L ¹	PC2A-EA ¹⁸
logK _{H1}	>9,1 ^a	11,90(2)	12,26(3)	11,44(1)	11,34
logK _{H2}	6,73(5)	5,44(2)	6,52(2)	10,31(2)	8,93
logK _{H3}	5,62(6)	5,28(2)	4,41(2)	4,71(5)	6,91
logK _{H4}	5,27(6)	1,36(2)	2,83(3)	2,76(5)	1,97
logK _{H5}	2,30(5)	-	-	2,22(4)	-
ΣlogK _{Hi}	>29,05	23,98	26,02	31,5	18,25
logK _{MnL}	22,23(4)^b 22,4(2)^c	24,7(2)^c	19,47(2)^c	12,21(5)	19,01
logK _{MnHL}	3,04(3) ^b	-	4,38(2) ^c	10,42(3)	6,88
logK _{MnH2L}	-	-	-	3,87(4)	2,50
logK _{ZnL}	14,30(5)	14,70(8)	15,04(6)	15,59(3)	-
logK _{ZnHL}	8,88(3)	9,36(5)	9,73(5)	10,33(2)	-
logK _{ZnH2L}	5,44(2)	-	2,91(6)	3,28(1)	-
logK _{CuL}	>25	-	-	-	-
pMn ^d	12,71	12,59	9,82	6,65	9,27
pZn ^d	9,50	8,58	8,73	8,40	-

^a : Estimation limite inférieure du logK_{H1} à partir de Mn(HL⁹)* (pré-complexe).

^b : Calculée par titrage potentiométrique.

^c : Calculée par titrage relaxométrique.

^d : pM calculé pour c_M = c_L = 10⁻⁵ M, pH 7,4.

Chapitre 4

A cause de la précipitation observée au-delà de pH 9 lors du titrage du ligand L⁹, sa première constante de protonation ne peut pas être directement déterminée. Nous avons donc estimé logK_{HI} à 9,1, à partir de la première constante de protonation de l'intermédiaire [Mn(HL⁹)*]³⁺. La première constante de protonation du complexe [Zn(L⁹)]²⁺ (8,88) n'est pas très loin de cette valeur. On note que cela représente forcément une sous-estimation du logK_{HI} du ligand, car la déprotonation se passe nécessairement à un pH plus acide dans le complexe où le site de protonation se trouve à proximité d'une charge positive (du cation métallique). D'ailleurs, la première constante de protonation est considérablement plus élevée pour L¹⁰ et L¹¹. La sous-estimation du logK_{HI} va nécessairement engendrer une sous-estimation des constantes de stabilité des complexes ; cependant, elle n'influence pas le rapport des constantes de stabilité des complexes, ni les valeurs de pM. Par conséquent, les sélectivités entre les différents métaux ne seront pas faussées par l'estimation du logK_{HI}. On note qu'il serait assez raisonnable de penser que logK_{HI} est du même ordre de grandeur pour les trois ligands (autour de 12) et dans ce cas-là les constantes de stabilité des complexes du L⁹ seraient également plus élevées ; néanmoins, comme l'un de nos objectifs est justement d'augmenter la stabilité des complexes de Mn²⁺, nous préférons risquer une sous-estimation qu'une éventuelle surévaluation de la stabilité.

Les valeurs des constantes de protonation des trois ligands indiquent clairement une seule étape de protonation en milieu basique où une des amines tertiaires (N3 ou N7) est protonée. Ceci signifie que le bicycle peut accepter un seul proton (qui va certainement conduire à la formation d'un pont hydrogène : N3⁺-H---N7), et par conséquent, la conformation du bicycle est très probablement chaise-chaise.¹⁹ Par analogie avec d'autres ligands de type bispidine,^{5, 15, 20-22} la première constante de protonation pour les bispidines L⁹⁻¹¹ est donc attribuée à l'un des groupes amine tertiaire, tandis que l'autre amine du noyau bicyclique reste non protonée dans la conformation chaise-chaise du ligand.

Les autres constantes de protonation correspondent aux pyridines et au carboxylate (L¹⁰ et L¹¹). En ce qui concerne la stabilité des complexes métalliques étudiés, tout d'abord il faut noter que dans le cas de chacun des trois ligands, la forme des courbes de titrages est différente pour le Mn²⁺ et pour le Zn²⁺ et la courbe de Mn²⁺ passe toujours en dessous de celle de Zn²⁺. Ceci montre sans ambiguïté que le complexe de Mn²⁺ est plus stable que le complexe de Zn²⁺.

Les valeurs de constantes de stabilité révèlent des différences logK de 4 à 6 ordres de grandeur en faveur du Mn²⁺. On note que la méthode potentiométrique et relaxométrique donnent des

Etude de ligands de type bispidine sélectifs au Mn(II) vs. le Zn(II)

$\log K_{[MnL]}^2$ très similaires pour $[Mn(L^9)]^{2+}$ (22,23 et 22,4, respectivement), ce qui permet de valider l'approche du titrage relaxométrique.

En revanche, le complexe $[Cu(L^9)]^{2+}$ est très stable, voir trop stable pour déterminer sa constante de stabilité par potentiométrie, donc la valeur de $\log K_{Cu(L^9)} = 25$ est certainement une sous-estimation. Afin d'accéder à la vraie constante de stabilité, une étude de compétition avec un autre ligand pourrait être faite.

Alors, contrairement aux bispidines penta- et hexa-dentées étudiées dans le Chapitre 3, ces bispidines forment des complexes de Mn^{2+} plus stables que ceux basés sur le Zn^{2+} en solution aqueuse, avec une très bonne discrimination. Ces résultats révèlent un autre potentiel des ligands de type bispidine, mise à part leur inertie exceptionnelle.

Ils représentent les premiers exemples de sélectivité réelle et efficace vis-à-vis du couple Mn^{2+}/Zn^{2+} , car avec les deux exemples de sélectivité que nous retrouvons dans la base de données des constantes de stabilité de l'IUPAC, les différences de $\log K$ sont inférieures à 1.²

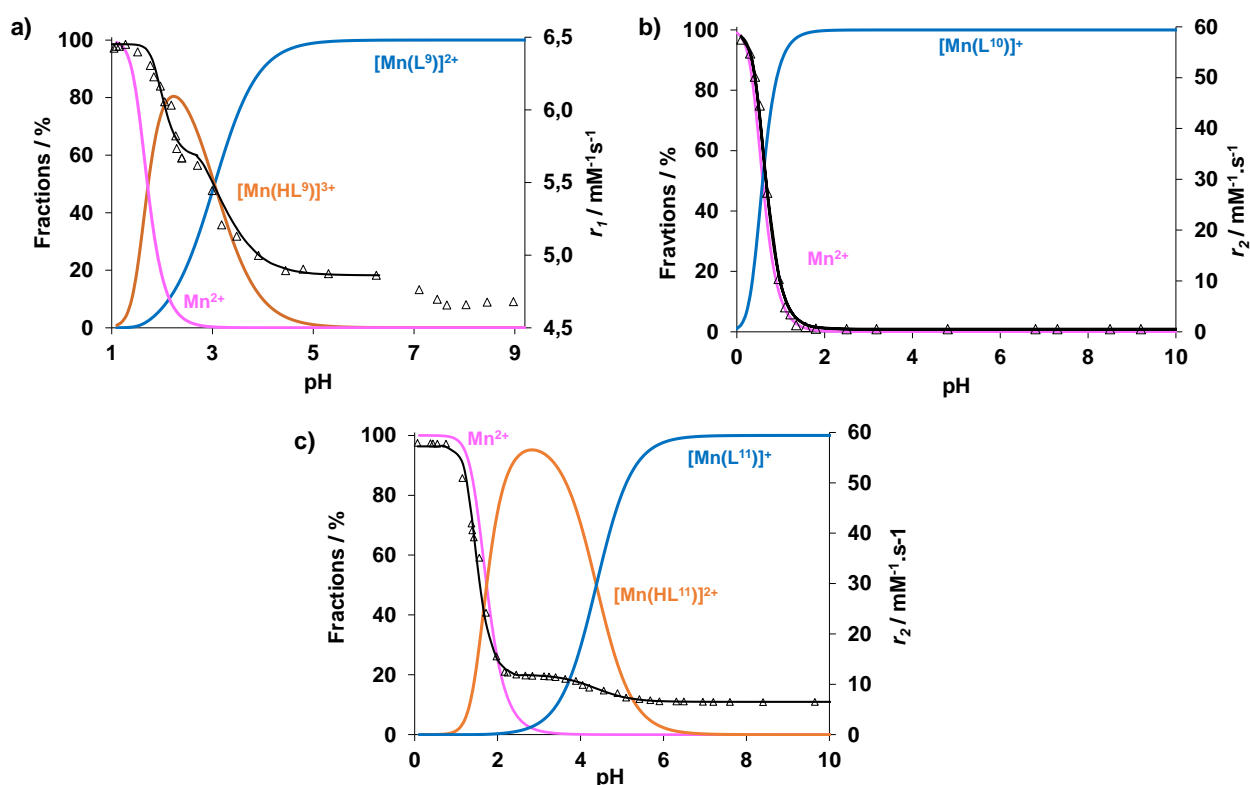


Figure 4.6 : Courbes de distribution des espèces chimiques et de l'évolution de la relaxivité en fonction du pH. Les courbes ($r_1 = f(pH)$) représentent les fits obtenus lors des calculs effectués par la méthode du titrage relaxométrique. a) $Mn(L^9)$; b) $Mn(L^{10})$; c) $Mn(L^{11})$. $c_{Mn^{2+}} = c_L = 2 \text{ mM}$.

Chapitre 4

Les profils qui illustrent l'évolution de la relaxivité en fonction du pH valident parfaitement les courbes de distribution, et donc les constantes de stabilité déterminées par titrage potentiométrique et relaxométrique. Le plateau observé dans l'évolution de la relaxivité à partir du pH 1 pour $[\text{Mn}(\text{L}^{10})]^+$, pH 4 pour $[\text{Mn}(\text{L}^9)]^{2+}$ et pH 5 pour $[\text{Mn}(\text{L}^{11})]^+$ coïncide avec la formation totale des complexes.

La variation modeste de la relaxivité du $\text{Mn}(\text{L}^9)$ observée entre pH 6,5 et 7,8 ne correspond pas à un équilibre de protonation (figure 4.6-a).

Nous observons une valeur de relaxivité transversale paramagnétique très basse, $r_2 = 0,52 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, pour $[\text{Mn}(\text{L}^{10})]^+$ qui témoigne l'absence de molécule d'eau en première sphère de coordination. Ceci suggère que tous les atomes donneurs du ligand sont coordonnés au Mn^{2+} , ce qui justifie la stabilité plus élevée par rapport aux deux autres complexes de Mn^{2+} . Donc, l'augmentation de la denticité renforce la stabilité du complexe, accompagnée d'une perte de la molécule du solvant en première sphère de coordination, et en conséquence son utilisation pour l'IRM ne sera pas envisageable, mais le complexe reste intéressant pour des applications en TEP. En revanche, $[\text{Mn}(\text{L}^9)]^{2+}$ et $[\text{Mn}(\text{L}^{11})]^+$ possèdent des relaxivités plus élevées qui impliquent nécessairement une molécule d'eau dans la première sphère. En supposant que le nombre total de coordination est identique pour $[\text{Mn}(\text{L}^9)]$ et $[\text{Mn}(\text{L}^{11})]$, on peut conclure que la substitution de l'acétate (L^{11}) par une pyridine (L^9) conduit à un complexe de Mn^{2+} plus stable.

Les trois ligands ont une sélectivité tout à fait exceptionnelle pour le Mn^{2+} vis-à-vis du Zn^{2+} , néanmoins cette sélectivité est meilleure pour L^{10} ($\Delta \log K_{\text{ML}} = 10$), et elle diminue pour la L^9 ($\Delta \log K_{\text{ML}} \geq 8$) et la L^{11} ($\Delta \log K_{\text{ML}} = 4$). Il semble que la pyridine est particulièrement intéressante pour la stabilisation du complexe de Mn^{2+} et pour la sélectivité. Ceci n'est pas étonnant, car c'est un groupement plus encombrant que l'acétate, ce qui contribue à une meilleure différenciation entre les deux métaux selon leur taille.

Pour une comparaison plus significative de la stabilité des complexes Mn^{2+} , dont la basicité des ligands est différente, nous avons également calculé leur pM ($\text{pM} = -\log[\text{M}_{\text{libre}}]$, à pH 7,4, et à des concentrations totales de ligand et de métal de 10^{-5} M).

Les valeurs de pMn obtenues, particulièrement pertinentes pour des applications biologiques des complexes de Mn^{2+} , sont respectivement égales à 12,71, 12,59 et 9,82 pour $[\text{Mn}(\text{L}^9)]^{2+}$, $[\text{Mn}(\text{L}^{10})]^+$ et $[\text{Mn}(\text{L}^{11})]^+$, et sont sensiblement plus élevées par rapport à celles des complexes de Mn^{2+} considérés comme particulièrement stables, tels que $[\text{Mn}(\text{DOTA})]^-$ ($\text{pMn} = 9,02$),²³

Etude de ligands de type bispidine sélectifs au Mn(II) vs. le Zn(II)

$[\text{Mn}(\text{PC2A-EA})]^+$ ($p\text{Mn} = 9,27$)²⁴ ou $[\text{Mn}(\text{PCTA})]^-$ ($p\text{Mn} = 9,02$)²⁵ ayant la valeur la plus élevée parmi les complexes de Mn^{2+} publiés dans la littérature.

Ces résultats de stabilité et les sélectivités des ligands pour le Mn^{2+} vs. le Zn^{2+} ont pu être confortés par les structures cristallines des complexes (figure 4.7). Chacun des ligands forme un complexe octa-coordiné avec le Mn^{2+} . Dans le cas des deux ligands hepta-dentés (L^9 et L^{11}), la sphère de coordination est complétée à 8 par une molécule de solvant ou de contre-ion ; alors que dans le complexe $[\text{Mn}(\text{L}^{10})]^+$, tous les huit atomes donneurs du ligand sont coordonnés au métal. Dans la structure de $[\text{Mn}(\text{L}^9)]^{2+}$ et de $[\text{Mn}(\text{L}^{10})]^+$, l'azote d'une pyridine est plus éloigné du centre métallique que les autres atomes donneurs ; néanmoins, sa paire d'électrons pointe vers le cation, donc on peut considérer qu'il y a interaction/cooordination au métal.

Ces trois systèmes font partie des rares exemples des complexes de Mn^{2+} octa-coordinés,⁸⁻¹² et cela conforte l'hypothèse selon laquelle la cavité de ces bispidines est large et bien adaptée au Mn^{2+} .

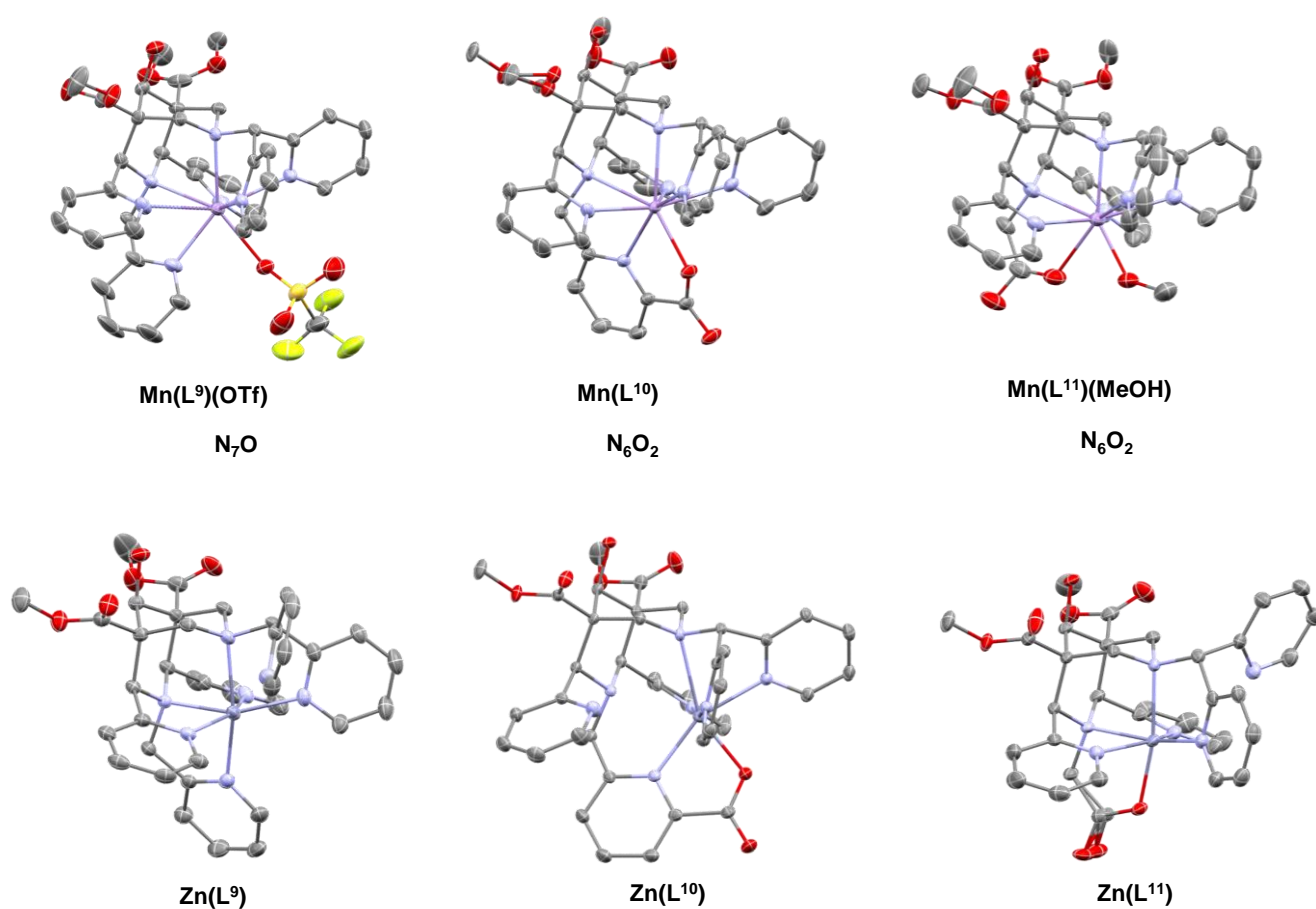


Figure 4.7: Structures cristallines des complexes Mn(L) et Zn(L).

Chapitre 4

En contraste avec les complexes de Mn^{2+} , les analogues Zn^{2+} ont une structure très différente (figure 4.7). Le nombre de coordination est de $NC = 6$, car la plus petite taille du Zn^{2+} ne permet pas de former autant de liaisons que dans le cas du Mn^{2+} ($NC = 8$). En effet, l'azote d'une des pyridines (L^9 , L^{10} et L^{11}) et un azote du noyau bicyclique dans le cas de L^{10} restent non-coordinés et cette différence de coordination est donc l'origine de la sélectivité des ligands.

Le tableau 4.2 ci-dessous représente les données numériques des structures déterminées par des études cristallographiques.

Tableau 4.2 : Distances de liaison sélectionnées [Å] et angles [°] dans la structure cristalline de $Mn(L^9)(OTf)$, $Mn(L^{10})$, $Mn(L^{11})(MeOH)$, $Zn(L^9)$, $Zn(L^{10})$ et $Zn(L^{11})$.

	Mn(L⁹)	Mn(L¹⁰)	Mn(L¹¹)	Zn(L⁹)	Zn(L¹⁰)	Zn(L¹¹)
Distance (Å)						
M-N3	2,4527(17)	2,3592(15)	2,502(3)	2,155(3)	2,745(1)	2,1266(13)
M-N7	2,4079(16)	2,5521(15)	2,357(3)	2,208(3)	2,4791(11)	2,2017(13)
M-Npy1	3,037(2)	2,3636(18)	2,373(3)	2,134(3)	3,806(1)	2,3902(15)
M-Npy2	2,2937(19)	2,910(2)	2,354(4)	2,534(3)	2,1601(12)	2,1505(15)
M-D(N3)	2,2728(18)	2,2412(17)	2,370(3)	2,149(3)	2,1363(12)	2,0358(12)
M-Ndpy1	2,2520(18)	2,4233(17)	2,621(3)	3,374(3)	2,1643(12)	2,0185(14)
M-Ndpy2	2,5487(17)	2,3773(18)	2,496(3)	2,059(3)	2,2300(12)	3,5609(15)
M-O _x	2,3804(16)	2,2015(14)	2,182(3)	-	2,1244(10)	-
Angle (°)						
N3-M-N7	72,42(5)	73,37(5)	75,25(10)	84,81(5)	65,69(4)	84,81(5)
Ndpy1-M-Ndpy2	130,92(6)	129,37(6)	131,51(11)	153,40(5)	120,67(4)	153,40(5)

Par ailleurs, ces structures cristallines montrent également que les complexes de Mn^{2+} et de Zn^{2+} sont en conformation chaise-chaise.

Etude de ligands de type bispidine sélectifs au Mn(II) vs. le Zn(II)

Sur les courbes de titrage potentiométrique (figure 4.5), nous avons observé que l'amine tertiaire est protonée en milieu faiblement basique pour les complexes de Zn^{2+} . Afin de mieux comprendre le comportement du système et de suivre en particulier l'étape de déprotonation, nous avons réalisé des titrages RMN 1H et UV-visible du complexe $Zn(L^{10})$ en fonction du pH, et la figure 4.8 illustre les résultats obtenus.

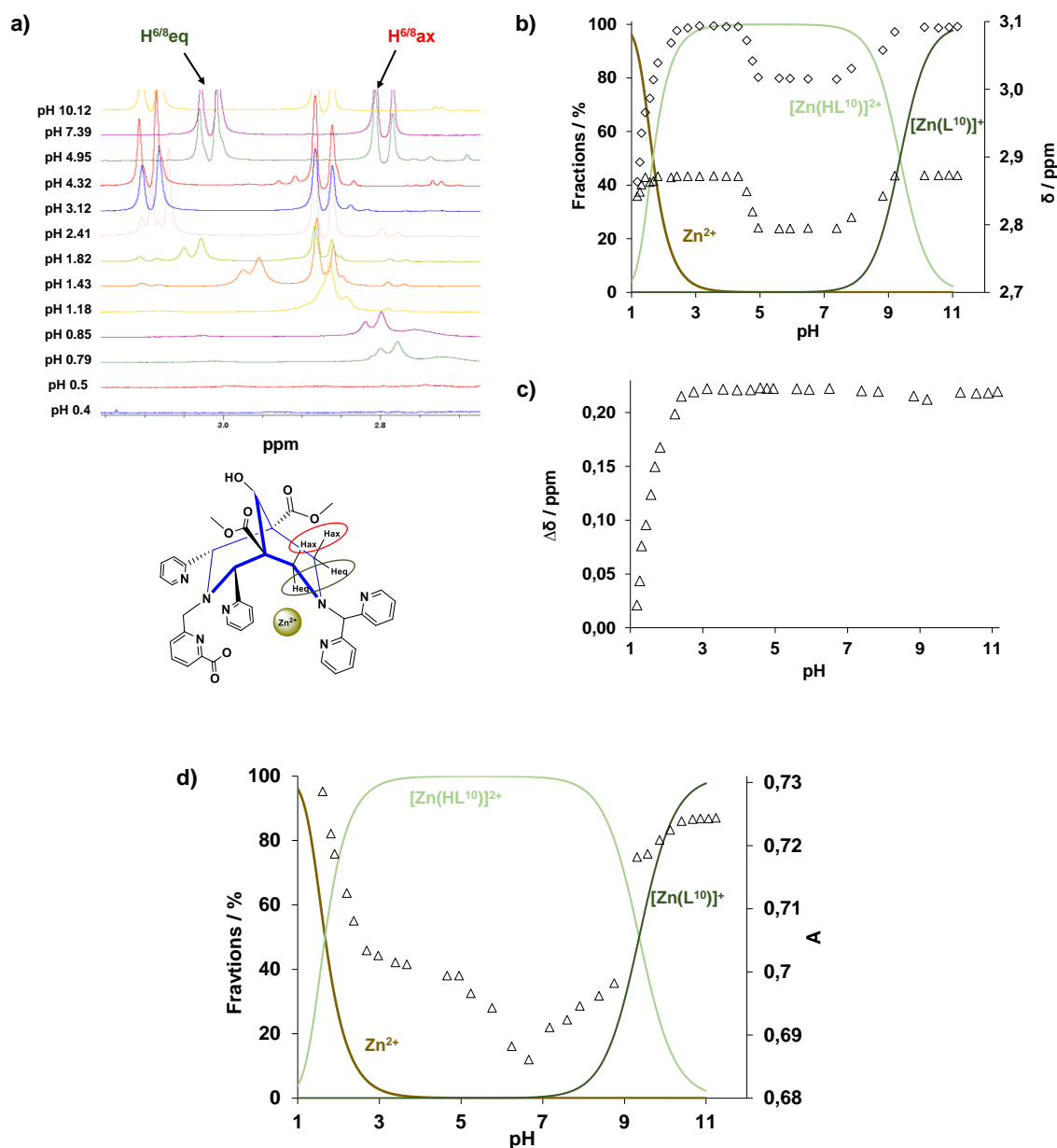


Figure 4.8 : a) Spectres RMN 1H de $Zn(L^{10})$ de la région où on observe les protons $H^{6/8}ax-eq$ à pH variable, $c_{L10} = c_{Zn^{2+}} = 3,5 \text{ mM}$; b) Distribution des espèces et évolution des déplacements chimiques des protons $H^{6/8}ax-eq$ en fonction du pH (\diamond : $H^{6/8}eq$, Δ : $H^{6/8}ax$), $c_{L10} = c_{Zn^{2+}} = 3,5 \text{ mM}$; c) Evolution de la différence de déplacements chimiques entre les protons $H^{6/8}$ équatoriaux et axiaux en fonction du pH ; d) Distribution des espèces et évolution de la bande d'absorption des pyridines en fonction du pH à 258 nm, $c_{L10} = c_{Zn^{2+}} = 50 \mu\text{M}$.

Chapitre 4

Tout d'abord, on observe que la distribution des espèces en fonction du pH, telle qu'elle est calculée à l'aide des constantes thermodynamiques obtenues en potentiométrie, est en parfaite accord avec l'évolution des déplacements chimiques des protons $H^{6/8}$ axiaux et équatoriaux (figure 4.8-b) et de la bande d'absorption des pyridines dans les gammes de pH où le complexe protoné se forme et ensuite se déprotone (figure 4.8-d ; pour plus de clarté, nous avons tracé l'absorbance à la longueur d'onde de 258 nm). Les figures 4.8-a et c montrent clairement que les protons $H^{6/8}$ axiaux et équatoriaux deviennent non-équivalents lors de la formation du complexe entre pH 1,5 et 3, nous suggérant que la complexation s'accompagne d'une perte de la flexibilité du ligand. La déprotonation ($\log K_{[Zn(HL10)]^{2+}} = 9,36$) est de nouveau accompagnée par des changements dans les spectres de RMN et UV-Vis.

En plus de ces changements attendus, nous observons une variation supplémentaire dans les déplacements chimiques des protons $H^{6/8}$ axiaux et équatoriaux ainsi que dans le spectre UV-vis vers pH 5-7. Cependant, cette variation ne correspond pas à un processus de protonation détecté sur les courbes potentiométriques. Elle n'impacte pas non plus la rigidité du cycle pipéridine qui porte l'azote N7, donc il ne s'agit pas de la déprotonation de l'amine tertiaire (voir figure 4.8-c). En revanche, la figure 4.8 et surtout les résultats UV-Vis, directement dépendants des pyridines, nous suggère que ce phénomène met en jeu une ou plusieurs pyridine(s), et ceci pourrait être la conséquence d'un réarrangement structural du ligand à travers les sites N3 et N(py2) du cycle pipéridine(N3) comme illustré sur la figure 4.9.

Etude de ligands de type bispidine sélectifs au Mn(II) vs. le Zn(II)

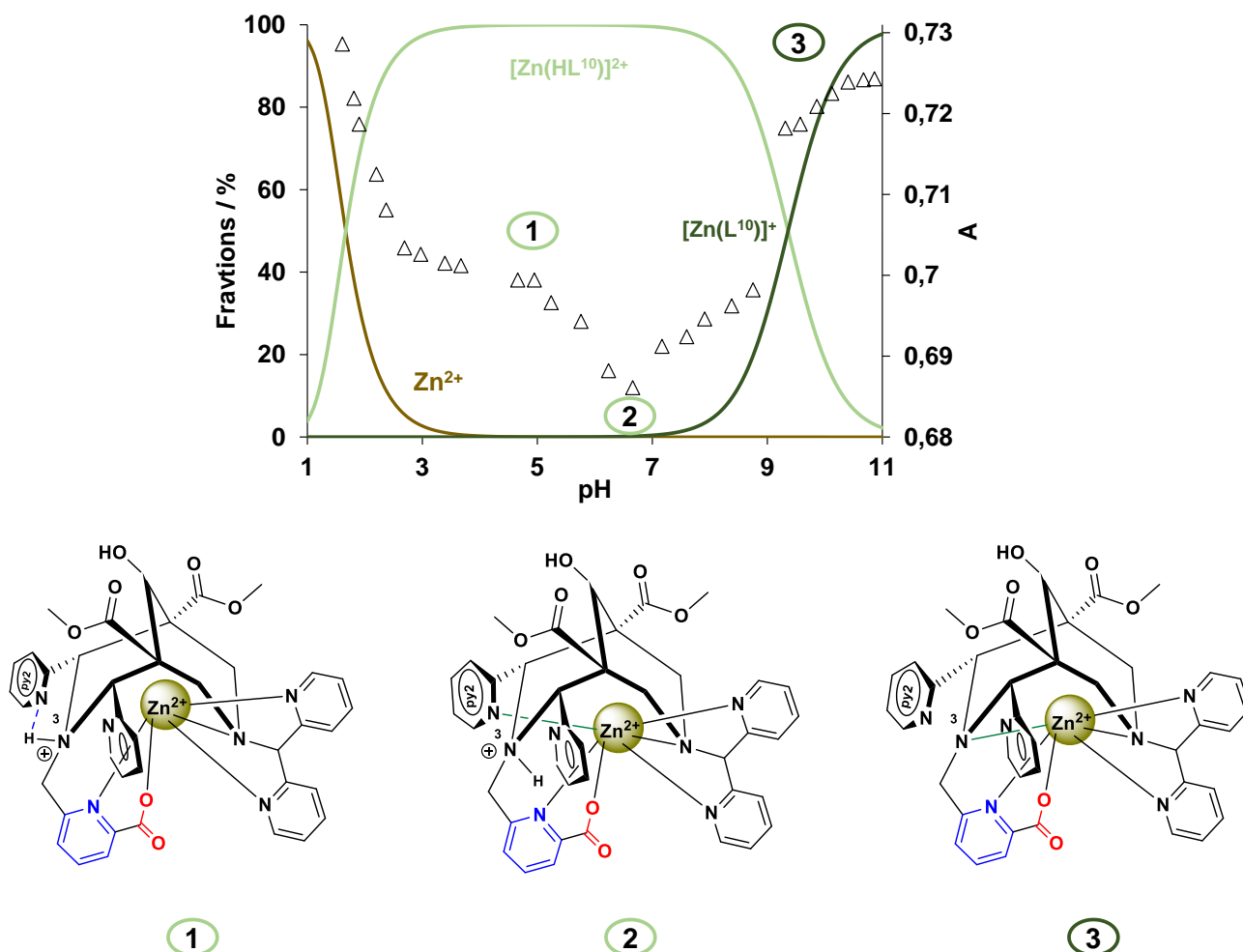


Figure 4.9 : Illustration de l'hypothèse impliquant un réarrangement structural du ligand qui pourrait expliquer les changements spectroscopiques observés en RMN de ¹H et en UV-Vis pour le complexe Zn(L¹⁰), c_{L10} = c_{Zn2+} = 50 μM .

D'ailleurs, cette hypothèse semble également être confortée par une étude DFT réalisée par nos collaborateurs à Heidelberg. Ces calculs DFT avaient pour but de déterminer l'énergie minimale du complexe [Zn(L¹⁰)]⁺ en fonction de la structure, et en particulier des atomes non coordonnés au Zn²⁺. Ils ont observé une sorte de plateau dans les minima des énergies avec plusieurs structures, notamment les plus basses énergies sont obtenues pour les isomères dont les sites N(py2) ou N3 ne sont pas coordonnés (figure 4.10). Il est plausible alors que la variation des déplacements chimiques et de l'absorbance UV-vis observée à partir de pH 5 soit la conséquence d'un réarrangement structural mettant en jeu ces sites de coordination.

Chapitre 4

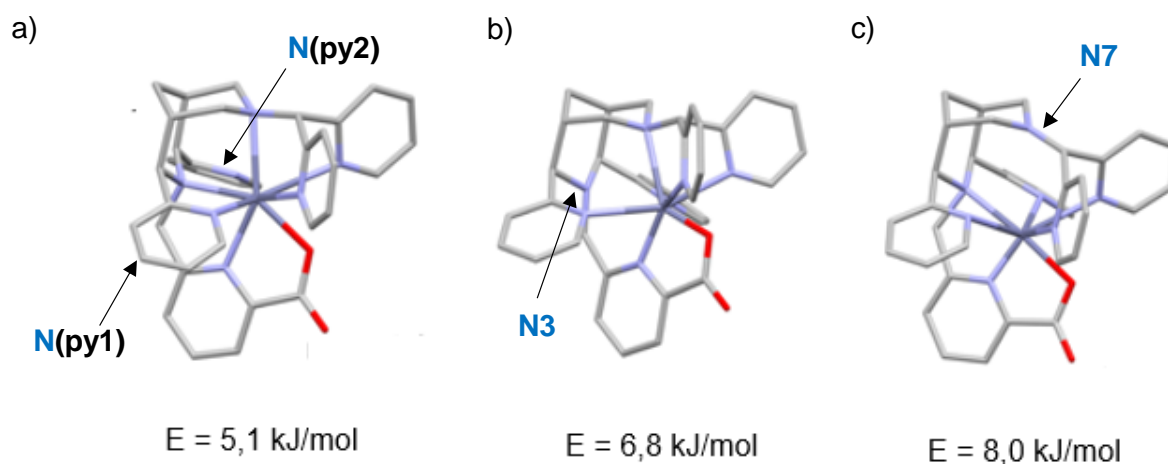


Figure 4.10 : Energies minimales calculées pour le complexe $\text{Zn}(\text{L}^{10})$ en fonction de l'atome non coordonné : a) $\text{N}(\text{py}2)$ non coordonné; b) $\text{N}3$ non coordonné et c) $\text{N}7$ non coordonné. A noter que le trait entre le métal et la $\text{N}(\text{py}1)$ correspond à une distance très longue ($3,8 \text{ \AA}$) et ne représente pas une liaison.

En conclusion, l'augmentation de la taille de la cavité de coordination à travers l'augmentation de la denticité favorise la sélectivité du Mn^{2+} au détriment du Zn^{2+} . Ces études ont dévoilé une autre facette exceptionnelle des bispidines, car l'ordre de stabilité observé va à l'encontre de celui prédit par la série d'Irving-Williams entre le Mn^{2+} et le Zn^{2+} , et conforte le fait que la cavité bicyclique de ces bispidines est très adaptée à la complexation du Mn^{2+} .

2. Inertie des $[\text{Mn}(\text{L}^{9-11})]$

Les études thermodynamique ont révélé une très bonne sélectivité des L^{9-11} au Mn^{2+} , cependant l'étude de leur inertie est autant plus importante, si des applications biologiques sont envisagées. L'augmentation de la denticité du ligand est très favorable à la stabilité, néanmoins, elle peut potentiellement devenir un problème pour l'inertie. La présence de plus de sites coordinants peut faciliter la formation des complexes ternaires qui sont importants dans les réactions de transmétallation. Ce phénomène a été observé par exemple dans la famille des complexes de Mn^{2+} formés par des ligands basés sur un noyau pyridine, où le temps de demi-vie de dissociation diminue de 55 s ($[\text{Mn}(\text{dapy}1)]^-$) à 0,024 s ($[\text{Mn}(\text{dapy}2)]^{2-}$) en rajoutant un groupement acétate de plus sur le ligand (pH 7,4 et $c_{\text{Cu}^{2+}} = 10^{-5} \text{ M}$; voir figure 4.11 pour les structures).²⁶

Etude de ligands de type bispidine sélectifs au Mn(II) vs. le Zn(II)

En plus, en inspectant les données cristallographiques, nous remarquons qu'au sein des complexes de Mn^{2+} (figure 4.11), certaines liaisons M---N(donneur) sont allongées (voir tableau 4.2), et cet allongement pourrait se traduire par un affaiblissement relatif de la liaison entre le Mn^{2+} et les atomes donneurs. Ce phénomène pourrait être favorable à l'initiation d'une réaction de transmétallation entre le Mn^{2+} et le Zn^{2+} ou le Cu^{2+} .

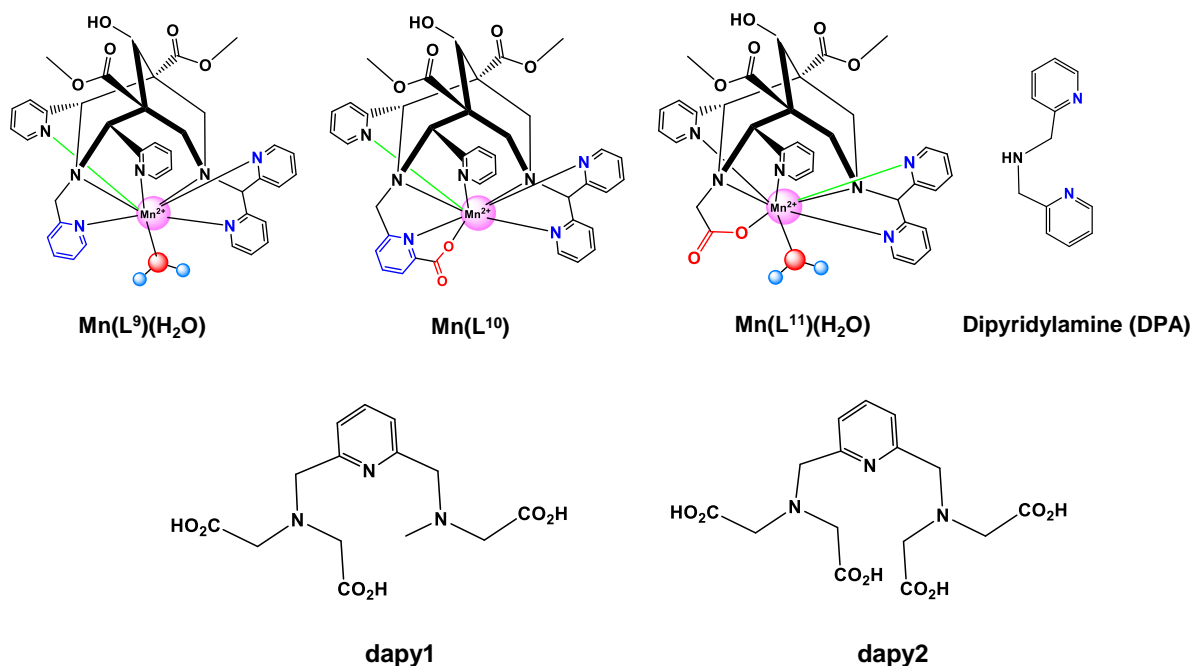


Figure 4.11 : Structures des complexes et molécules étudiés dans cette partie. (—) :représente les liaisons relativement allongées. $D(Mn---N(Py1)) = 3,04 \text{ \AA}$; $D(Mn---N(Py2)) = 2,91 \text{ \AA}$; $D(Mn---N(dpy1)) = 2,62 \text{ \AA}$.

Nous avons évalué l'inertie des $[Mn(L^{9-11})]$ en présence du Zn^{2+} et du Cu^{2+} pour $[Mn(L^9)]^{2+}$.

2.1. Cinétique de dissociation en présence du Zn^{2+}

Selon les constantes de stabilité déterminées précédemment, le Zn^{2+} , même présent en grand excès, ne devrait pas remplacer le Mn^{2+} dans ces complexes, donc aucune transmétallation n'est attendue avec le Zn^{2+} . Néanmoins, les essais réalisés dans des conditions « classiques » de pseudo-premier ordre, en mettant en jeu 25 équivalents de Zn^{2+} par rapport au complexe, à

Chapitre 4

37°C, dans des solutions tamponnées à pH 6 (MES), témoignent d'une transmétallation. Pour suivre la réaction, nous avons mesuré le temps de relaxation transversale en fonction du temps ; et en effet, la relaxivité détectée à l'équilibre correspond à celle du Mn^{2+} libre (figure 4.12).

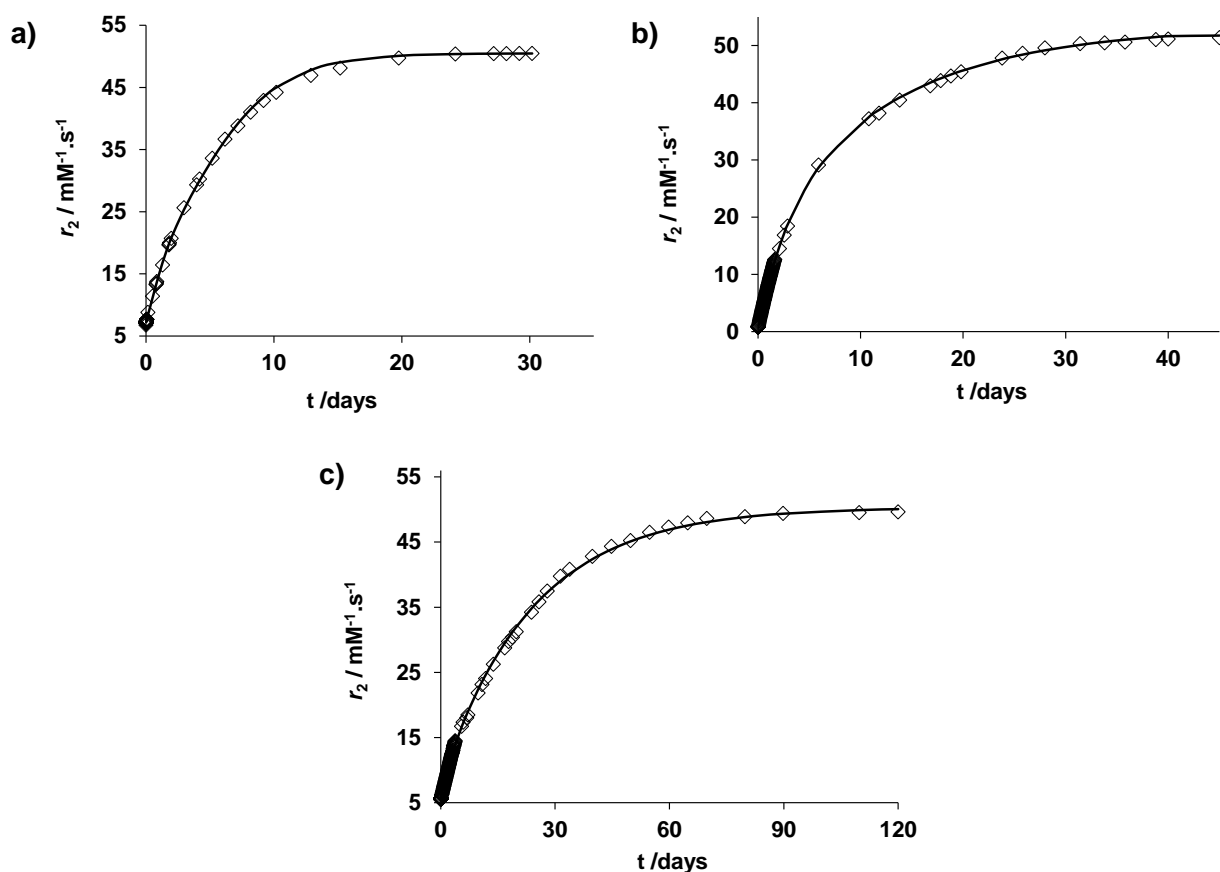


Figure 4.12 : Variation du r_2 en fonction du temps au cours de la transmétallation par le Zn^{2+} . 60 MHz, 37 °C, $c_{MnL} = 1,4 \text{ mM}$, $c_{Zn} = 35 \text{ mM}$, $c_{MES} = 50 \text{ mM}$. a) $[Mn(L^9)]^{2+}$; b) $[Mn(L^{10})]^+$ et c) $[Mn(L^{11})]^+$. Les courbes représentent les ajustements des données expérimentales avec une fonction biexponentielle.

Etant donné le nombre élevé de sites de coordination au sein de ces ligands, ces résultats nous ont mené à poser l'hypothèse d'une probable formation d'un complexe de Zn^{2+} dinucléaire qui serait plus stable que le complexe de Mn^{2+} . En plus, ces ligands sont dotés d'une partie similaire aux dérivés du dipyridylamine (figure 4.11) connus pour leur grande affinité au Zn^{2+} .^{16, 27-28}

De ces constats, nous avons déterminé la stabilité d'éventuel complexe de Zn^{2+} dinucléaire par titrage potentiométrique, en présence de deux équivalents de Zn^{2+} entre pH 1,8 et 11. Les courbes de titrage potentiométrique sont représentées sur la figure 4.13.

Etude de ligands de type bispidine sélectifs au Mn(II) vs. le Zn(II)

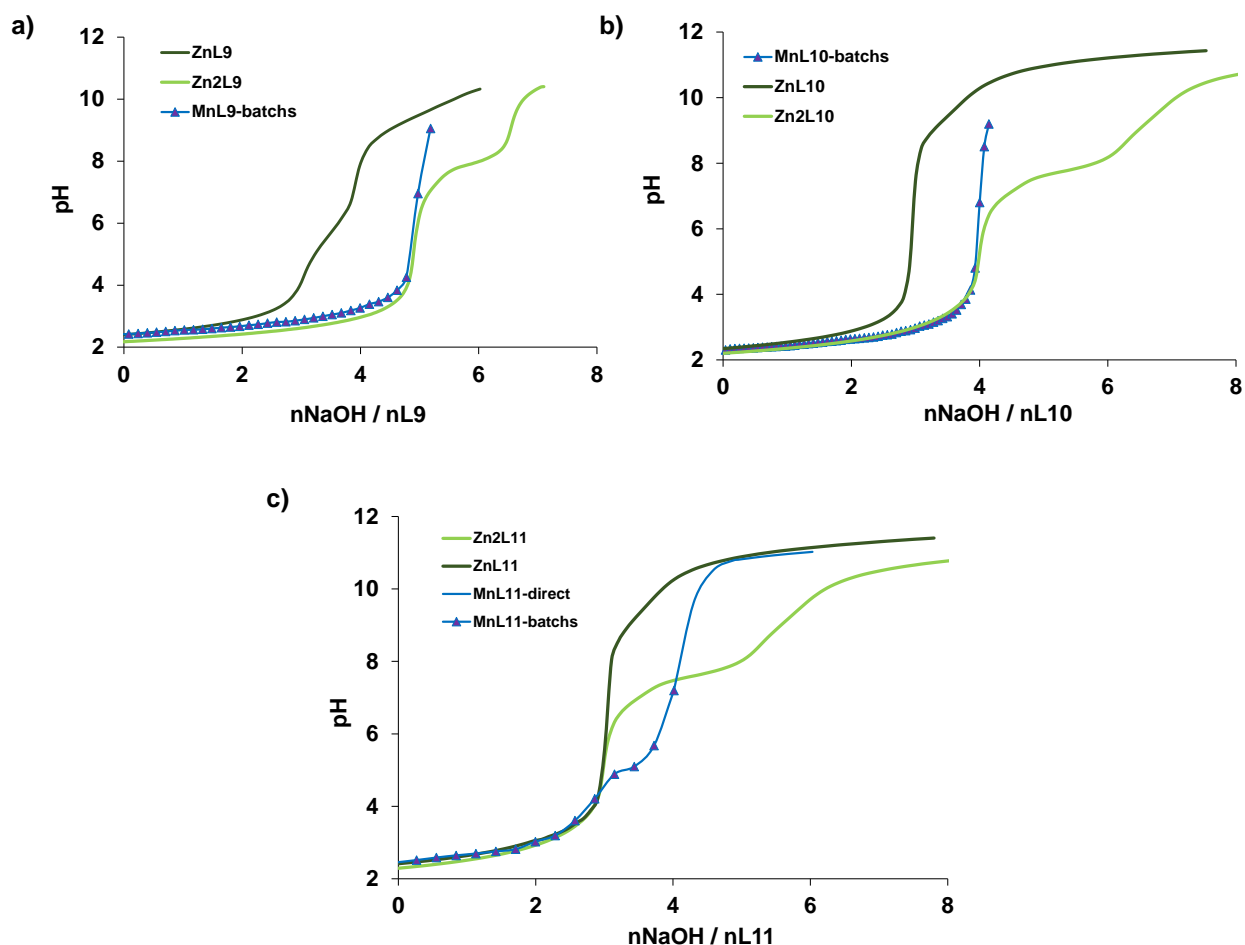


Figure 4.13 : Courbes de titrage potentiométrique des ligands en présence des métaux. $c_L = 2 \times 10^{-3} M$; $c_{Mn^{2+}} = 2 \times 10^{-3}$, $c_{Zn^{2+}} = 2 \times 10^{-3}$ pour $Zn(L)$ et $4 \times 10^{-3} M$ pour $Zn_2(L)$; 25 °C ; $I = 0,15 M NaCl$.

Ces courbes de titrage montrent sans ambiguïté la formation de complexes dinucléaires stables entre les ligands L^{9-11} et le Zn^{2+} . A noter qu'au-delà du pH 6, nous observons la formation de complexes hydroxo solubles. De façon étonnante, le nombre équivalent de protons titrés (par rapport au ligand) lors de la formation de ces complexes hydroxo n'est pas un nombre entier, mais égal respectivement à 1,5, 2,5, et 1,5 pour $[Zn_2(L^9)]^{4+}$, $[Zn_2(L^{10})]^{3+}$, et $[Zn_2(L^{11})]^{3+}$. Ces résultats sont parfaitement reproductibles et suggèrent la formation de complexes dimères (2 ligands, 4 Zn^{2+}) dans lesquels il existe au moins un pont hydroxyle. Vu la complexité des systèmes, nous n'avons pas cherché à les caractériser plus et nous avons analysé uniquement la partie acide des courbes de titrage pour calculer la constante de stabilité des complexes dinucléaires $[Zn_2(L)]$ à l'aide du logiciel Hyperquad 2008 (tableau 4.3 ; $\log\beta = [Zn_2(L)]/[Zn]^2 \times [L]$).

Chapitre 4

Tableau 4.3 : Constantes de stabilité des complexes $M_x(L)$; avec $x= 1$ ou 2 .

	L⁹	L¹⁰	L¹¹
logK_{Mn(L)}	22,23(4)	24,70(2)	19,47(2)
logK_{Zn(L)}	14,30(5)	14,70(8)	15,04(6)
logβ_{Zn2(L)}	25,36(3)	26,03(2)	22,21(4)

En utilisant ces constantes, nous avons calculé la distribution des espèces dans des conditions de l'étude de transmétallation (figure 4.14). Ces résultats montrent que les complexes dinucléaires $[Zn_2(L^{9-11})]$ sont plus stables que les complexes $[Mn(L^{9-11})]$, ce qui explique la décomplexation observée lors des études de cinétique de dissociation. On note que la formation d'un complexe dinucléaire est également à l'origine de la transmétallation du $[Gd(DTPA)]^{2-}$ par le Zn^{2+} . La constante de stabilité du $[Gd(DTPA)]^{2-}$ est supérieure à celle du $[Zn(DTPA)]^{3-}$ (les $\log K_{ML}$ sont respectivement 22,46 et 18,29), mais le complexe dinucléaire $[Zn_2(DTPA)]^-$ est relativement stable ($\log\beta_{Zn2(L)} = 22,77$).²⁹ D'ailleurs, des études réalisées par l'équipe du Pr. Peter Comba avaient révélées la formation de complexes dinucléaires avec des bispidines en présence de métaux de petite taille.⁶

Etude de ligands de type bispidine sélectifs au Mn(II) vs. le Zn(II)

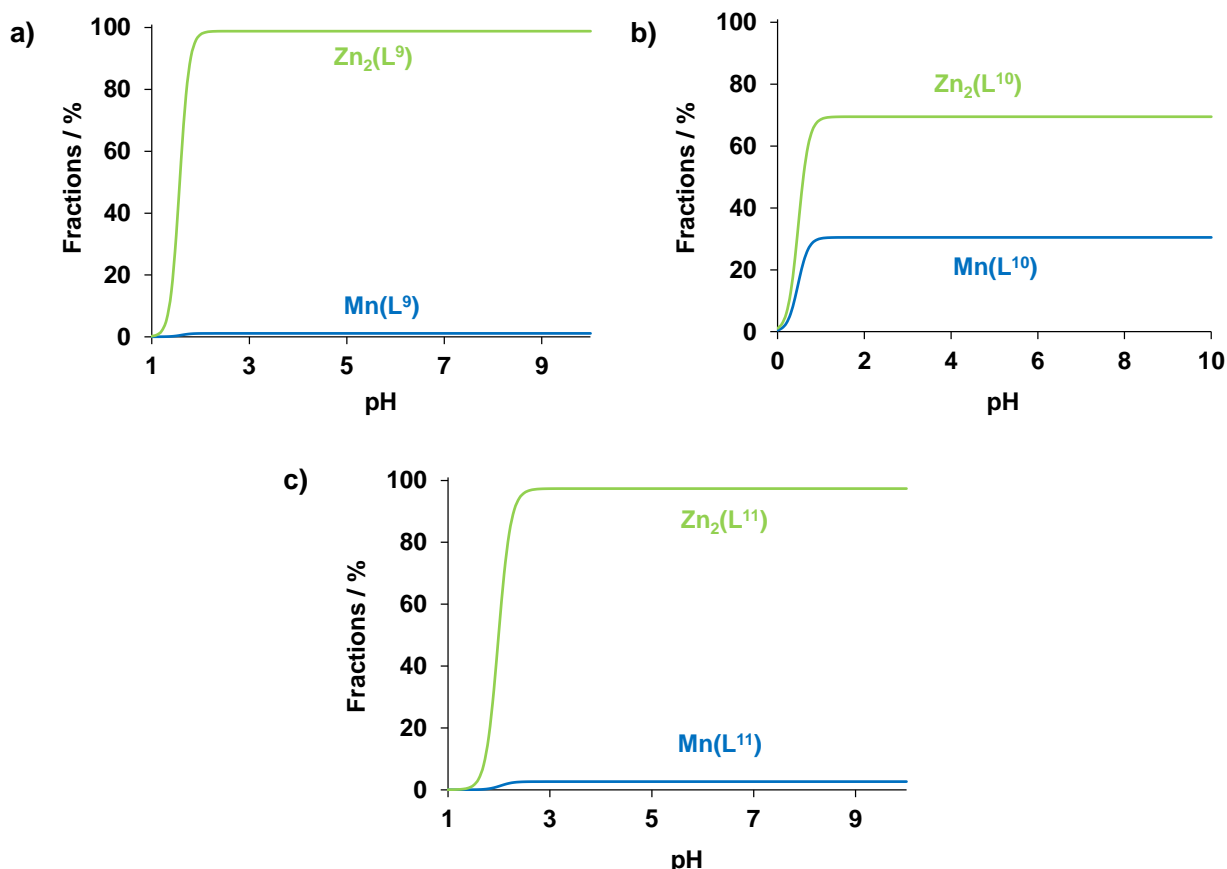


Figure 4.14 : Distribution des espèces en fonction du pH en présence de 10 équivalents de Zn^{2+} . $c_{MnL} = 1,4 \text{ mM}$, $c_{Zn} = 35 \text{ mM}$.

Les complexes de Mn^{2+} basés sur des bispidines penta-dentées avec une cavité bicyclique (chapitre 3) avaient une dissociation extrêmement lente, voire inexistante à pH 6 et en présence de 50 équivalents de Zn^{2+} (protocole standard). En contraste, pour $[Mn(L^9)]^{2+}$, $[Mn(L^{10})]^+$ et $[Mn(L^{11})]^+$, nous observons une décomplexation totale respectivement au bout de 20, 40, et 90 jours, dans les mêmes conditions (avec 25 equ Zn^{2+}). Alors, nous pouvons en déduire qualitativement que l'augmentation de la denticité s'accompagne d'une diminution de l'inertie.

Par ailleurs, contrairement aux cas étudiés dans le chapitre précédent, les courbes cinétiques de la figure 4.12 ne peuvent pas être décrites par une fonction mono-exponentielle comme ce qui serait attendue pour une cinétique de pseudo-premier ordre, mais par la somme de deux termes exponentiels (équation 4.1) :

$$\frac{1}{T_2} = A_0 - (a_1 e^{-k_{obs1}t} + a_2 e^{-k_{obs2}t}) \quad \text{équation 4.1}$$

Chapitre 4

Il n'est pas évident de connaître les raisons de cette observation ; l'explication la plus plausible est la présence de deux isomères en solution qui se dissocient de façon indépendante, avec une cinétique différente chacune caractérisée par un k_{obs} . Les deux facteurs a_1 et a_2 sont alors proportionnels à la concentration de chacune des deux espèces. Les courbes ont été analysées selon l'équation 4.1, et les valeurs obtenues pour les différents paramètres, ainsi que les temps de demi-vie calculés individuellement pour les deux processus de dissociation sont représentés dans le tableau 4.4 ci-dessous.

Tableau 4.4 : Constantes de vitesse de dissociation (k_{obs1} et k_{obs2}) et $t_{1/2} = \ln 2/k_{obs}$ des complexes étudiés en présence de 25 eq Zn^{2+} , 37°C, pH 6.

	$[Mn(L^9)]^{2+}$	$[Mn(L^{10})]^+$	$[Mn(L^{11})]^+$	$[Mn(PC2A-EA)]^+^{18}$	$[Mn(PyC3A)]^{-30}$
$k_{obs1} / 10^{-6} (s^{-1})$	19,72(3) /	4,86(2) /	5,16(2) /	660 /	3,54 /
/ $t_{1/2}$	9,76 h	39,60 h	37,20 h	0,29 h	54,4 h
$k_{obs2} / 10^{-6} (s^{-1})$	2,97(2) /	0,94(1) /	0,48(1) /	-	-
/ $t_{1/2}$	2,70 j	8,53 j	16,71 j		
a_1	26(4)	21(2)	4(1)	-	-
a_2	48(2)	52(1)	58(2)	-	-

$[Mn(L^{11})]^+$ détient la meilleure inertie. Ce résultat peut être mis en parallèle avec le fait que les liaisons M---(N ou O) donneur établies au sein de ce complexe (selon la structure cristallographique) sont moins allongées que celles de ses analogues, et en conséquence ces derniers pourraient être plus susceptibles à une éventuelle initiation d'une réaction de transmétallation. On note aussi que L^{11} forme le complexe dinucléaire $[Zn_2(L^{11})]^{3+}$ relativement le moins stable.

Même si ces complexes de Mn^{2+} sont moins inertes que ceux étudiés dans les chapitres précédents, $[Mn(L^9)]^{2+}$ et $[Mn(L^{11})]^+$ possèdent une inertie très intéressante qui reste meilleure

Etude de ligands de type bispidine sélectifs au Mn(II) vs. le Zn(II)

par rapport à celle des complexes mono-hydratés décrits dans le contexte de l'IRM (tableau 4.4).^{24, 30}

Afin de mieux comprendre le mécanisme de dissociation de ces complexes, nous avons suivi la transmétallation du complexe $[\text{Mn}(\text{L}^{10})]^+$ aux pH 3 et 5 en présence de Zn^{2+} à des concentrations variables (10, 20, 25, 40 ou 50 équ). Le choix de ce système pour une étude plus complète est essentiellement motivé par le fait que L^{10} nous permettra d'étudier au mieux les conséquences de la haute denticité du ligand.

La figure 4.15 représente l'évolution de la relaxivité transversale paramagnétique du $[\text{Mn}(\text{L}^{10})]^+$ en fonction du temps, à différentes concentrations de Zn^{2+} , à pH 3 et 5.

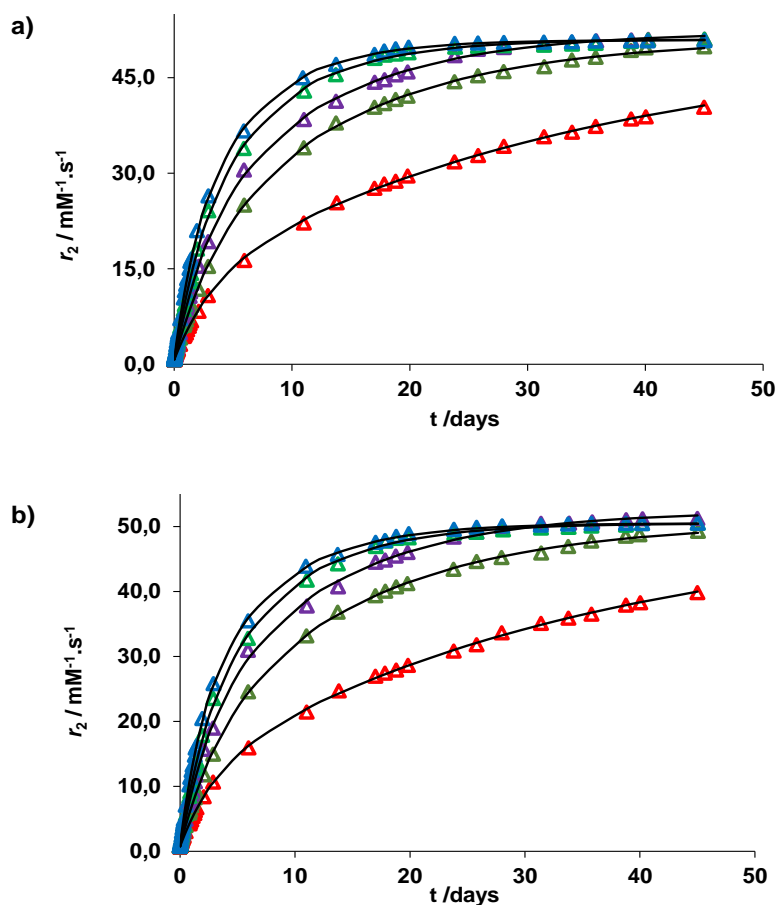


Figure 4.15 : Variation du r_2 en fonction du temps au cours de la transmétallation de $\text{Mn}(\text{L}^{10})$ par le Zn^{2+} . 60 MHz, 37 °C, $c_{\text{Mn}(\text{L}^{10})} = 1,4 \text{ mM}$. Δ : $c_{\text{Zn}^{2+}} = 14 \text{ mM}$; Δ : $c_{\text{Zn}^{2+}} = 28 \text{ mM}$; Δ : $c_{\text{Zn}^{2+}} = 35 \text{ mM}$; Δ : $c_{\text{Zn}^{2+}} = 56 \text{ mM}$; Δ : $c_{\text{Zn}^{2+}} = 70 \text{ mM}$. a) pH 3 et b) pH 5. Les courbes représentent les ajustements des données expérimentales à une fonction biexponentielle.

Chapitre 4

Toutes ces courbes montrent la même allure que celles de la figure 4.12 et peuvent être décrites par la somme de deux fonctions exponentielles. Les valeurs obtenues pour les constantes de vitesse k_{obs} et les facteurs de proportionnalité a_1 et a_2 par l'ajustement des courbes à l'équation 4.1 sont représentés dans le tableau 4.5.

Tableau 4.5: Constantes de vitesse de dissociation ($k_{\text{obs}1}$ et $k_{\text{obs}2}$) du complexe $\text{Mn}(\text{L}^{10})$ en présence de 10, 20, 25, 40 ou 50 équivalents de Zn^{2+} à pH 3, 5 et 25 equ à pH 6 ; 37°C.

pH	<u>Zn²⁺</u>					
	10 equ	20 equ	25 equ	40 equ	50 equ	
3	$k_{\text{obs}1}/10^{-6} (\text{s}^{-1})$	3,82(3)	3,76(2)	4,35(3)	4,91(5)	6,34(4)
	$k_{\text{obs}2}/10^{-6} (\text{s}^{-1})$	0,36(1)	0,83(1)	1,03(1)	1,56(2)	1,89(2)
	a_1	15,3(5)	20(1)	18(2)	20(4)	21(2)
	a_2	53,2(4)	52(1)	54(2)	50(4)	49(2)
	$k_{\text{obs}1}/10^{-6} (\text{s}^{-1})$	3,94(2)	3,66(2)	4,54(2)	5,25(3)	6,41(3)
	$k_{\text{obs}2}/10^{-6} (\text{s}^{-1})$	0,34(1)	0,80(1)	1,01(2)	1,54(2)	1,78(2)
5	a_1	15,2(3)	20(1)	16(2)	20(3)	25(2)
	a_2	54,9(3)	50(1)	55(3)	50(4)	45(1)
	$k_{\text{obs}1}/10^{-6} (\text{s}^{-1})$	-	-	4,86(2)	-	-
	$k_{\text{obs}2}/10^{-6} (\text{s}^{-1})$	-	-	0,94(1)	-	-
6	a_1	-	-	21(2)	-	-
	a_2	-	-	52(1)	-	-

Tout d'abord, on note que les facteurs a_1 et a_2 varient peu d'une courbe (un pH et une $c_{\text{Zn}^{2+}}$ donnés) à l'autre et correspondent à peu près à des fractions molaires de 0,7 pour l'espèce qui se dissocie plus lentement et de 0,3 pour l'autre. Cette relative invariance des a_1 et a_2 semble conforter l'hypothèse de deux espèces qui sont à l'origine de cette fonction biexponentielle.

Par ailleurs, nous avons vu plus haut que le $[\text{Zn}(\text{L}^{10})]^+$ peut avoir différents isomères en solution (résultats RMN, UV-Vis et DFT). Les mêmes études n'ont pas été faites pour le complexe de

Etude de ligands de type bispidine sélectifs au Mn(II) vs. le Zn(II)

Mn^{2+} et certes, l'isomérisation du $[Zn(L^{10})]^+$ est liée au fait que toutes les atomes donneurs du ligand ne peuvent pas se coordiner au métal. Néanmoins, pour le $[Mn(L^{10})]^+$ on note aussi une liaison plus allongée à l'état solide, et on peut imaginer qu'en solution deux espèces co-existent dans lesquelles ce n'est pas la même liaison qui est plus allongée, donc un peu plus faible. Evidemment ce n'est qu'une hypothèse et nous n'avons pas de preuve expérimentale concrète.

En inspectant les k_{obs} , on observe que, pour une concentration de Zn^{2+} donnée, la variation du pH de 3 à 6 a très peu d'effet. Par exemple, en présence de 25 équivalents de Zn^{2+} , nous avons calculé des constantes de vitesse de dissociation très similaires ($k_{obs2} = (1,03 \pm 0,03) \times 10^{-6}$, $(1,01 \pm 0,02) \times 10^{-6}$, et $(0,94 \pm 0,01) \times 10^{-6} s^{-1}$, respectivement à pH 3, 5 et 6.

Ces résultats suggèrent que la voie de dissociation proton-assistée est négligeable, contrairement à ce que nous avons observé pour les complexes de Mn^{2+} à base de bispidine étudiés dans le Chapitre 3. En effet, en représentant l'ensemble des valeurs de k_{obs1} ou de k_{obs2} en fonction de la concentration de Zn^{2+} , on obtient une seule droite, indépendamment du pH (figure 4.16). Il s'agit d'une observation très unique, car la catalyse par les protons représente une voie communément observée dans la dissociation des complexes métalliques.

Les données de la figure 4.16 ont été analysées en utilisant l'équation 4.2 ci-dessous pour calculer la constante de vitesse caractéristique de la voie métallo-assistée ($k_{Zn^{2+}}$) de la dissociation.

$$k_{obs} = k_0 + k_{Zn^{2+}} [Zn^{2+}] \quad \text{équation 4.2}$$

Chapitre 4

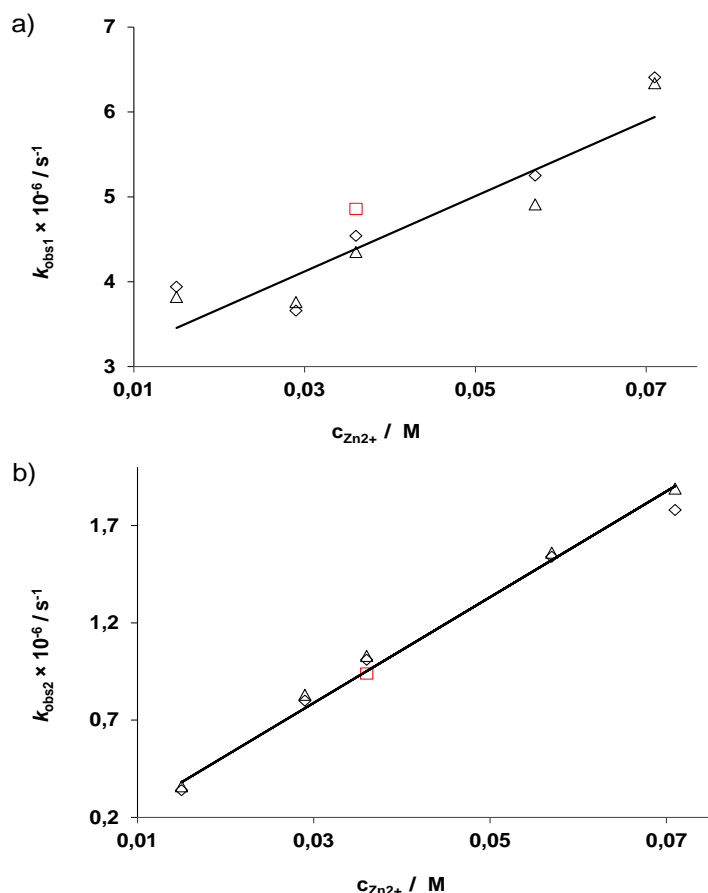


Figure 4.16 : a) et b) Variation respective de k_{obs1} et k_{obs2} en fonction de la concentration en Zn^{2+} . $c_{MnL(10)} = 1,4 \text{ mM}$. Δ : pH 3.0 ; \diamond : pH 5.0 ; \square : pH 6.0.

Les calculs sont effectués en fixant la constante de vitesse de la voie de dissociation spontanée, k_0 , à zéro, autrement nous obtenons une valeur avec une très grande erreur $k_0 = (4,34 \pm 4,12) \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$, suggérant que cette voie est négligeable, ou en tous cas n'est pas accessible dans nos conditions. On obtient alors $k_{Zn^{2+}} = (2,72 \pm 0,04) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ pour la constante de vitesse caractéristique de la voie de dissociation catalysée par le Zn^{2+} pour l'étape lente. Cette valeur est de 7 à 8 ordres de grandeur plus petite en comparaison par exemple à $1,45 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$, $1,13 \times 10^3 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ou $45 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ pour les complexes $[\text{Mn}(\text{dapy1})]^-$, $[\text{Mn}(\text{dapy2})]^{2-}$ ²⁶ ou $[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$ ³¹.

Elle est comparable à celle déterminée pour le $[\text{Mn}(\text{DOTA})]^{2-}$ ($k_{Zn^{2+}} = 1,5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) ³², un complexe reconnu pour son inertie.

En résumé, ces résultats suggèrent la présence de deux espèces en solution avec des cinétiques de dissociation différentes. Pour chacune des espèces, le mécanisme de dissociation est le

Etude de ligands de type bispidine sélectifs au Mn(II) vs. le Zn(II)

même, en impliquant uniquement la voie assistée par le Zn^{2+} , alors que la voie proton-catalysée n'est pas du tout observée. Ceci représente un cas unique, car la catalyse par les protons est très commune dans la dissociation des complexes métalliques.

2.2. Cinétique de dissociation en présence du Cu^{2+}

Nous avons également évalué l'inertie cinétique du $[\text{Mn}(\text{L}^9)]^{2+}$ en présence du Cu^{2+} , en réalisant des réactions de transmétallation dans des conditions de pseudo-premier ordre. Nous avons réalisé ces réactions à pH 2,30 ; 2,50 ; 2,70 ; 3,15 et 3,53 ; en variant le nombre d'équivalent du Cu^{2+} entre 10 et 40. On note que la précipitation des hydroxo-complexes de Cu^{2+} empêche la réalisation ces études aux pH plus élevés.

A titre d'exemple, la figure 4.17 représente l'évolution de la relaxivité transversale paramagnétique du $[\text{Mn}(\text{L}^9)]^{2+}$ en fonction du temps, à différentes concentrations de Cu^{2+} , à pH 3,15.

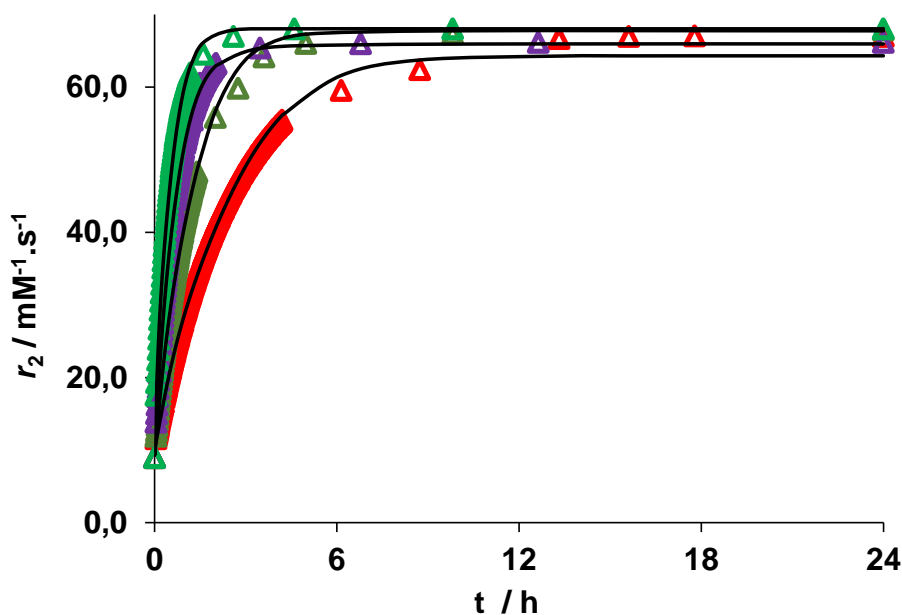


Figure 4.17 : Variation du r_2 en fonction du temps au cours de la transmétallation de $[\text{Mn}(\text{L}^9)]^{2+}$ par le Cu^{2+} . 60 MHz, 25 °C, pH 3,15 ; $c_{\text{Mn}(\text{L}^9)} = 1,6 \text{ mM}$. Δ : $c_{\text{Cu}^{2+}} = 16 \text{ mM}$; \triangle : $c_{\text{Cu}^{2+}} = 32 \text{ mM}$; \triangleleft : $c_{\text{Cu}^{2+}} = 48 \text{ mM}$; \blacktriangle : $c_{\text{Cu}^{2+}} = 64 \text{ mM}$. Les courbes représentent les ajustements des données expérimentales.

Nous observons qu'en présence du Cu^{2+} , la décomplexation est beaucoup plus rapide : pour la réaction la plus lente (en présence de 10 equ de Cu^{2+}), elle est totale en moins de 24 h.

Chapitre 4

Comme pour la transmétallation du $[\text{Mn}(\text{L}^{10})]^+$, les courbes cinétiques ne peuvent pas être décrites par une fonction monoexponentielle, elles ont été analysées en utilisant l'équation 4.3. Les constantes de vitesse de dissociation calculées, ainsi que les paramètres a_1 et a_2 sont représentées dans le tableau 4.6.

$$T_2 = A_0 - (a_1 \times e^{-k_{\text{obs}1}t} + a_2 \times e^{-k_{\text{obs}2}t}) \quad \text{équation 4.3}$$

Tableau 4.6 : Constantes de vitesse de dissociation ($k_{\text{obs}1}$ et $k_{\text{obs}2}$) du complexe $[\text{Mn}(\text{L}^9)]^{2+}$ en présence de 10, 20, 30 ou 40 équivalents de Cu^{2+} à différents pH.

pH		Cu^{2+}			
		10 equ	20 equ	30 equ	40 equ
2,30	$k_{\text{obs}1} / 10^{-3} (\text{s}^{-1})$	0,33(1)	0,52(2)	0,80(3)	1,00(2)
	$k_{\text{obs}2} / 10^{-3} (\text{s}^{-1})$	1,06(2)	1,78(2)	2,84(3)	3,23(3)
	a_1	0,010(1)	0,006(1)	0,004(2)	0,003(1)
	a_2	0,018(1)	0,012(2)	0,009(3)	0,007(2)
2,50	$k_{\text{obs}1} / 10^{-3} (\text{s}^{-1})$	0,32(1)	0,54(2)	0,73(2)	1,06(3)
	$k_{\text{obs}2} / 10^{-3} (\text{s}^{-1})$	1,04(3)	1,67(3)	2,78(4)	3,19(3)
	a_1	0,011(1)	0,005(1)	0,005(2)	0,002(1)
	a_2	0,020(1)	0,012(2)	0,010(3)	0,006(2)
2,70	$k_{\text{obs}1} / 10^{-3} (\text{s}^{-1})$	0,34(1)	0,56(2)	0,73(2)	1,01(0,4)
	$k_{\text{obs}2} / 10^{-3} (\text{s}^{-1})$	1,02(4)	1,75(3)	2,72(3)	3,26(4)
	a_1	0,010(1)	0,007(1)	0,004(2)	0,002(1)
	a_2	0,019(1)	0,013(2)	0,008(3)	0,005(2)
3,15	$k_{\text{obs}1} / 10^{-3} (\text{s}^{-1})$	0,33(1)	0,58(2)	0,78(2)	1,09(4)
	$k_{\text{obs}2} / 10^{-3} (\text{s}^{-1})$	0,96(2)	1,69(2)	2,68(2)	3,17(3)
	a_1	0,009(1)	0,006(1)	0,003(2)	0,003(1)
	a_2	0,016(1)	0,013(2)	0,008(3)	0,006(2)
3,53	$k_{\text{obs}1} / 10^{-3} (\text{s}^{-1})$	0,40(1)	0,57(1)	0,84(0,2)	1,08(2)
	$k_{\text{obs}2} / 10^{-3} (\text{s}^{-1})$	0,95(2)	1,67(3)	2,71(3)	3,15(3)
	a_1	0,012(1)	0,005(1)	0,004(2)	0,004(1)
	a_2	0,020(1)	0,011(2)	0,010(3)	0,009(2)

Etude de ligands de type bispidine sélectifs au Mn(II) vs. le Zn(II)

Le caractère biexponentiel des courbes est probablement lié à la présence de deux isomères, donc la même hypothèse peut être proposée que dans le cas précédent. Comme pour Mn(L¹⁰), ici aussi le rapport de a_1/a_2 reste constant (dans la marge d'erreur) pour l'ensemble des expériences, ce qui encore une fois conforte cette hypothèse. L'isomère majoritaire dont la fraction molaire est ~0,7 se dissocie plus vite, alors que l'isomère minoritaire se dissocie avec une vitesse plus petite.

Comme nous l'avons observé pour la transmétallation du [Mn(L¹⁰)]⁺ en présence du Zn²⁺, la dissociation du [Mn(L⁹)]⁺ est aussi indépendante de la concentration en H⁺, en conséquence la voie de dissociation proton-assistée est négligeable. En effet, en traçant l'ensemble des k_{obs1} ou k_{obs2} , on obtient une droite pour chacune des deux séries.

Afin de déterminer la constante de vitesse de la voie métallo-assistée, $k_{Cu^{2+}}$, nous avons analysé les données de la figure 4.18 en utilisant l'équation 4.4. La figure 4.18 représente la variation des k_{obs1} et k_{obs2} en fonction de la concentration en Cu²⁺, à différents pH.

$$k_{obs} = k_0 + k_{Cu^{2+}} [Cu^{2+}] \quad \text{équation 4.4}$$

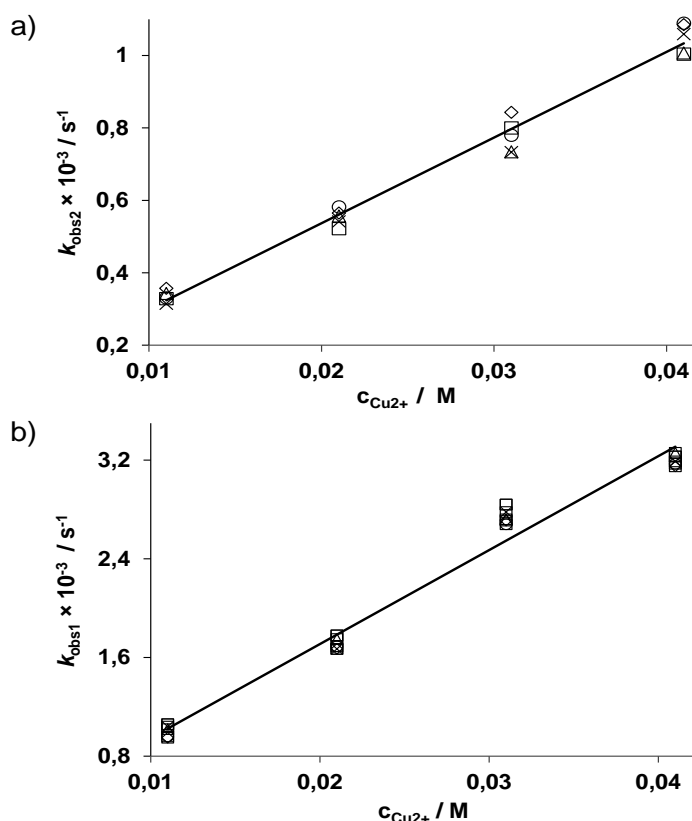


Figure 4.18 : Variation des k_{obs} en fonction de la concentration en Cu^{2+} . \square : pH 2,30 ; \times : pH 2,50 ; Δ : pH 2,70 ; \circ : pH 3,15 \diamond : pH 3,53. $c_{\text{Mn(L}^9\text{)}} = 1,6 \text{ mM}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Chapitre 4

A partir des calculs, en fixant k_0 à zéro, nous obtenons une valeur de $k_{\text{Cu}^{2+}}$ égale à $(2,35 \pm 0,05) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$, supérieure au moins de deux ordres de grandeur par rapport à celle obtenue en présence du Zn^{2+} pour $[\text{Mn}(\text{L}^{10})]^+$. Bien que $k_{\text{Zn}^{2+}}$ n'ait pas été déterminée pour $[\text{Mn}(\text{L}^9)]^{2+}$, nous avons une comparaison directe des vitesses de transmétallation entre $[\text{Mn}(\text{L}^9)]^{2+}$ et $[\text{Mn}(\text{L}^{10})]^+$ (tableau 4.6) qui montre que la dissociation est ~ 4 fois plus rapide pour $[\text{Mn}(\text{L}^9)]^{2+}$ (pH 6, 25 eq Zn^{2+}). De façon générale, on trouve très rarement des données comparatives entre Zn^{2+} et Cu^{2+} dans les cinétiques de dissociation des complexes métalliques. Néanmoins, le Cu^{2+} a été mentionné 5-10 fois (en fonction de la température) plus actif dans la transmétallation du $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$ que le Zn^{2+} .²⁹

Dans notre cas, un phénomène supplémentaire peut également intervenir. Le manganèse et le cuivre peuvent tous les deux avoir une activité redox. On peut alors imaginer que la présence du Cu^{2+} conduit à une oxydation du Mn^{2+} en Mn^{3+} qui a une taille plus petite, moins adaptée à la taille de la cage de coordination de la bispidine. En parallèle, la réduction du Cu^{2+} en Cu^+ se traduit par une augmentation de la taille du cation (le rayon du Cu^+ approximatif est 1,2 fois plus élevé que celui du Mn^{2+}) qui sera donc plus adapté à la « cavité bicyclique ». Alors, cette réaction d'oxydoréduction aurait pour conséquence la catalyse de la décomplexation, réalisée par voie métallos-assistée.

Afin de procéder à une expérience très préliminaire dans ce contexte, nous avons réalisé une réaction de transmétallation en mélangeant des quantités équimolaires du Cu^{2+} et du $[\text{Mn}(\text{L}^9)]^{2+}$, à 37 °C, pH 3. A la fin de la réaction, on obtient une solution incolore, au lieu d'une solution de couleur bleu, caractéristique des complexes de Cu^{2+} basés sur des ligands N(donneur). Ce résultat reflète la formation très probable d'un complexe de Cu^+ qui est incolore. Evidemment, cette réaction et le changement de couleur n'étaient pas observables dans le cas des expériences cinétiques conduites en présence d'un large excès du Cu^{2+} . La figure 4.19 illustre ce phénomène. Pour confirmer cette hypothèse de transformation redox, d'autres études (RPE par exemple) seront nécessaires.

Etude de ligands de type bispidine sélectifs au Mn(II) vs. le Zn(II)

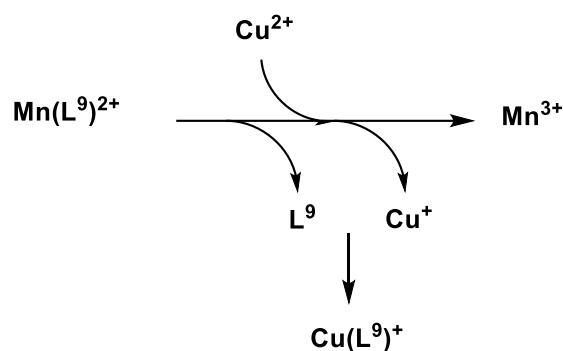


Figure 4.19 : Illustration du phénomène redox contribuant à la dissociation du $[\text{Mn(L}^9\text{)}]^{2+}$ en présence du Cu^{2+} .

Ces résultats ont encore une fois démontrée la complexité structurale des bispidines, dont quelques modifications engendrent d'importants changements sur les propriétés physico-chimiques des complexes de Mn^{2+} .

Malgré l'inertie relativement moins bonne des complexes $[\text{Mn(L}^{9-11})]$ par rapport à certains des complexes étudiés dans le Chapitre 3, elle reste suffisante pour que nous puissions les utiliser pour d'éventuelles études biologiques.

Par la suite, nous avons étudié les propriétés de relaxation de $[\text{Mn(L}^9\text{)}]^{2+}$ et $[\text{Mn(L}^{11})]^+$ pour lesquels les études cristallographiques et les mesures de relaxivité ont révélé la présence d'une molécule du solvant en première sphère de coordination.

3. Propriétés de relaxation

Pour évaluer l'efficacité de relaxation de $[\text{Mn(L}^9\text{)}]^{2+}$ et $[\text{Mn(L}^{11})]^+$, nous avons enregistré leurs profils NMRD entre 0,5-80 MHz à deux températures, 25 et 37 °C.

Ces mesures ont été complétées par des études RMN de ^{17}O à température variable afin de déterminer les facteurs qui gouvernent la relaxivité, en particulier les paramètres caractérisant l'état d'hydratation du complexe, l'échange d'eau et la rotation (q , k_{ex} , τ_{H}). Toutes ces données de RMN de ^{17}O et de relaxivité ont été analysées ensemble. Les ajustements ont été faits *via* Matlab selon la théorie de Solomon-Bloembergen-Morgan pour décrire la relaxation paramagnétique en utilisant les équations décrites dans l'annexe.

La figure 4.20 représente les profils NMRD et l'évolution de la vitesse de relaxation transversale réduite de ^{17}O en fonction de l'inverse de la température.

Chapitre 4

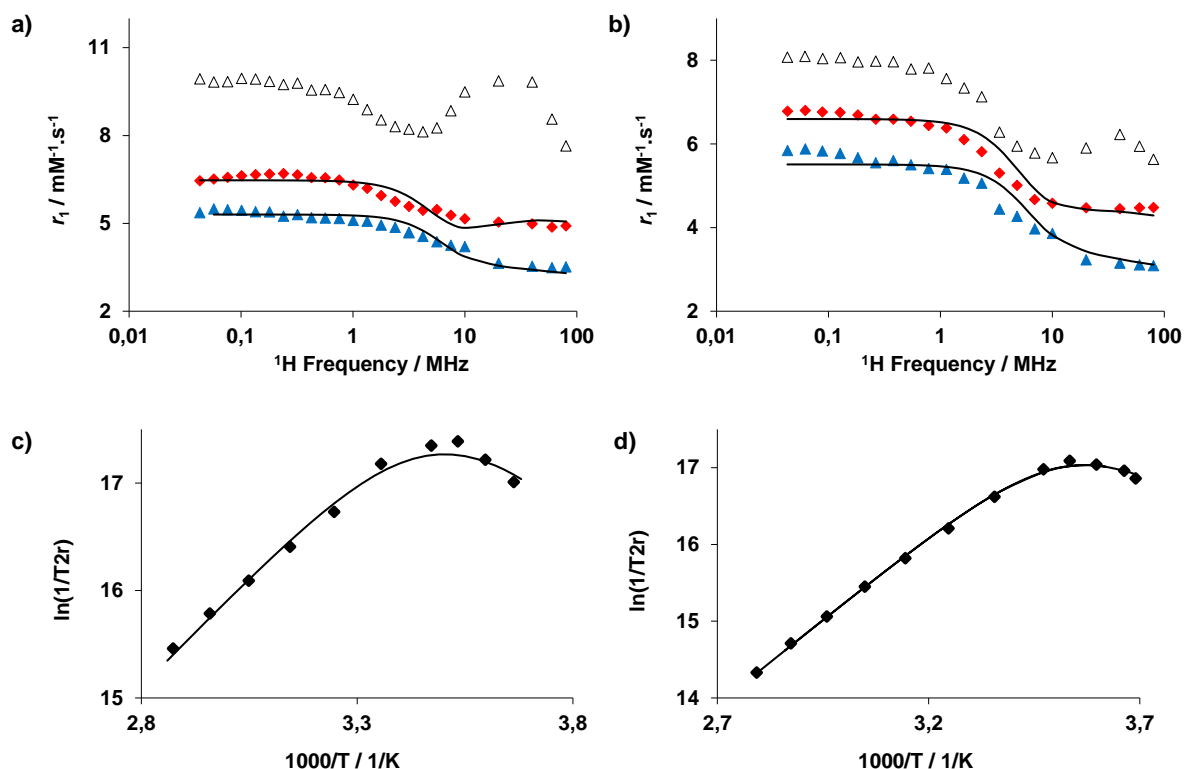


Figure 4.20 : a-b) Profils NMRD respectifs de $Mn(L^9)$ et $Mn(L^{11})$; \blacklozenge : 25°C; \blacktriangle : 37°C ; \triangle : 25°C en présence de l' HSA ; c-d) Variation de la vitesse de relaxation transversale réduite de l' ^{17}O en fonction de l'inverse de la température. a) et c) $Mn(L^9)$; b) et d) $Mn(L^{11})$. Les courbes représentent les ajustements.

À 60 MHz, 25 °C, nous observons des relaxivités respectives de 4,87 et 4,47 $mM^{-1}.s^{-1}$ pour $[Mn(L^9)]^{2+}$ et $[Mn(L^{11})]^+$. Nous notons une très bonne relaxivité pour ces complexes, comparable à celle des agents de contraste à base de Gd^{3+} de petite taille ;³³ et un peu plus élevée par rapport à celle du complexe $[Mn(HL^1)]$ (4,14 $mM^{-1}.s^{-1}$).

En présence de l' HSA, à 20 MHz, 25 °C, nous observons des augmentations respectives de la relaxivité de 102 et 39 % pour $[Mn(L^9)]^{2+}$ et $[Mn(L^{11})]^+$. Très certainement, l'affinité à l'albumine est bien plus importante pour le $[Mn(L^9)]^{2+}$ par rapport à son analogue, grâce à la présence du groupement pyridine hydrophobe à la place du carboxylate en position N3 du noyau bicyclique. En plus d'une affinité plus haute, la rigidité de la liaison peut être également plus importante, et ces deux facteurs conduisent à une augmentation remarquable de la relaxivité. Les relaxivités transversales de l' ^{17}O à température variable nous renseignent sur le nombre de molécule en première sphère de coordination, selon la méthode de Gale et. al.³⁴ Le maximum de ces courbes ont révélé la présence d'une molécule d'eau en première sphère de coordination pour les deux complexes, en parfait accord avec les structures cristallines (figure 4.21).

Etude de ligands de type bispidine sélectifs au Mn(II) vs. le Zn(II)

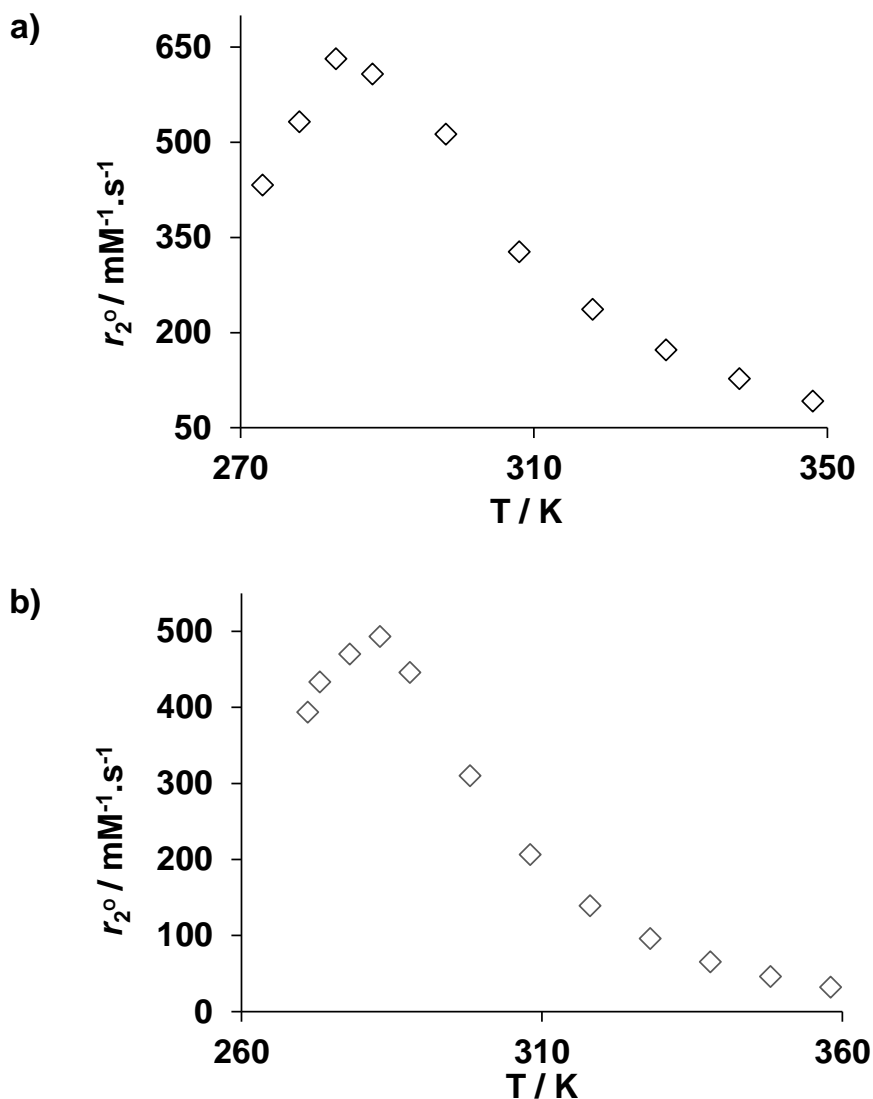


Figure 4.21 : Variation de la relaxivité transversale de l' ^{17}O en fonction de la température. a) $[\text{Mn}(\text{L}^9)]^{2+}$; b) $[\text{Mn}(\text{L}^{11})]^+$. 400 MHz.

Pour calculer les paramètres microscopiques qui gouvernent la relaxivité, nous avons procédé à la même démarche que celle utilisée dans le Chapitre 3.

Les paramètres obtenus sont représentés dans le tableau 4.7.

Chapitre 4

Tableau 4.7: Paramètres caractérisant l'échange d'eau et la relaxivité des complexes étudiés.

	Mn(L⁹)	Mn(L¹¹)	Mn(HL¹)
Poids moléculaire (g.mol ⁻¹)	710,10	676,18	578,18
r_1 (mM ⁻¹ .s ⁻¹) / 60 MHz / 25°C	4,87	4,47	4,14
q	1	1	1
$k_{\text{ex}}^{298} / 10^7$ (s ⁻¹)	11,9(4)	13,5(5)	5,1(7)
ΔH^\ddagger (kJ.mol ⁻¹)	31,4 (5)	34,0(6)	10,6 (1)
ΔS^\ddagger (kJ.mol ⁻¹)	+15	+25	-62(8)
E_{rH} (kJ.mol ⁻¹)	31(2)	22(3)	22(1)
τ_{rH}^{298} (ps)	137(4)	110(4)	100(5)
τ_{v}^{298} (ps)	24(2)	23(2)	24(10)
$\Delta^2 / 10^{-19}$ (s ⁻²)	0,96(7)	0,83(3)	0,8(1)
$A_0/\hbar / 10^6$ (rad.s ⁻²)	38,0(5)	30,3(5)	28,0(1)

Nous observons un échange d'eau à peu près deux fois plus rapide avec ces complexes par rapport au [Mn(HL¹)]. Cette différence est probablement liée à un changement de mécanisme d'échange, qui devient dissociatif comme en témoigne la valeur positive des entropies d'activation, en contraste avec le mécanisme associatif et la valeur très fortement négative du ΔS^\ddagger pour [Mn(HL¹)]. Ceci est la conséquence évidente de la différence de la sphère de coordination, un complexe octa-coordiné de Mn²⁺ aura forcément un échange d'eau dissociatif car il ne peut plus accueillir une molécule d'eau supplémentaire en première sphère de coordination, alors qu'un complexe hexa-coordiné a un échange associatif.

Nous n'observons pas de différence notable entre ces deux complexes, mis à part le temps de corrélation rotationnelle (τ_{rH}) qui est en accord avec leur poids moléculaire. D'ailleurs, c'est la

Etude de ligands de type bispidine sélectifs au Mn(II) vs. le Zn(II)

taille légèrement plus importante de ces deux complexes par rapport à celle du $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ qui est responsable de la très bonne relaxivité, et ceci malgré le fait que le remplacement des deux carboxylates du L^1 par des esters devrait certainement diminuer la contribution de la seconde sphère à la relaxivité (qui n'a pas été prise en compte dans nos analyses).

Avec la bonne efficacité observée avec $[\text{Mn}(\text{L}^{11})]^+$, accompagnée d'une très bonne inertie, nous avons réalisé des études *in vivo* et *ex vivo* sur des souris saines.

Le choix de $[\text{Mn}(\text{L}^{11})]^+$ par rapport à $[\text{Mn}(\text{L}^9)]^{2+}$ repose sur plusieurs critères : (i) il est cinétiquement plus inerte, (ii) il se lie moins à l'albumine, (iii) il a une meilleure solubilité, et (iv) la charge positive est plus petite, car la charge positive pourrait être source de toxicité.

4. Etudes *in vivo* (IRM : Pharmacocinétique) et *ex vivo* (ICP-MS : Biodistribution)

Dans un premier temps, nous avons réalisé une étude *in vivo* chez des souris saines ($n = 3$), afin d'évaluer des paramètres pharmacocinétiques, tels que la clairance et le temps de demi-vie de $[\text{Mn}(\text{L}^{11})]^+$, en comparaison au DOTAREM utilisé en diagnostic clinique.

Nous avons injecté par voie intraveineuse aux souris une dose inférieure de 80 % (0,02 mmol/kg) à celle utilisée en diagnostic clinique avec les complexes de Gd^{3+} .³⁵⁻³⁸ La figure 4.22 représente l'évolution du signal IRM normalisé au niveau des reins et les images de certains organes, tels que les reins, la rate, les poumons, etc, obtenues à différents temps après injection.

Au bout de deux minutes après l'injection, nous observons un signal hyperintense au niveau des reins, et beaucoup plus intense que celui obtenu avec le DOTAREM à la même dose (0,02 mmol/kg). Ceux-ci suggèrent que la clairance est rénale et rapide, comme nous l'avons observé avec $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$. Le temps de demi-vie du complexe dans le sang est estimée à 25 min. Ces résultats illustrent la très bonne efficacité du $[\text{Mn}(\text{L}^{11})]^+$, car avec une dose aussi faible pour des études en IRM, nous obtenons une intensité de signal très intéressante.

Chapitre 4

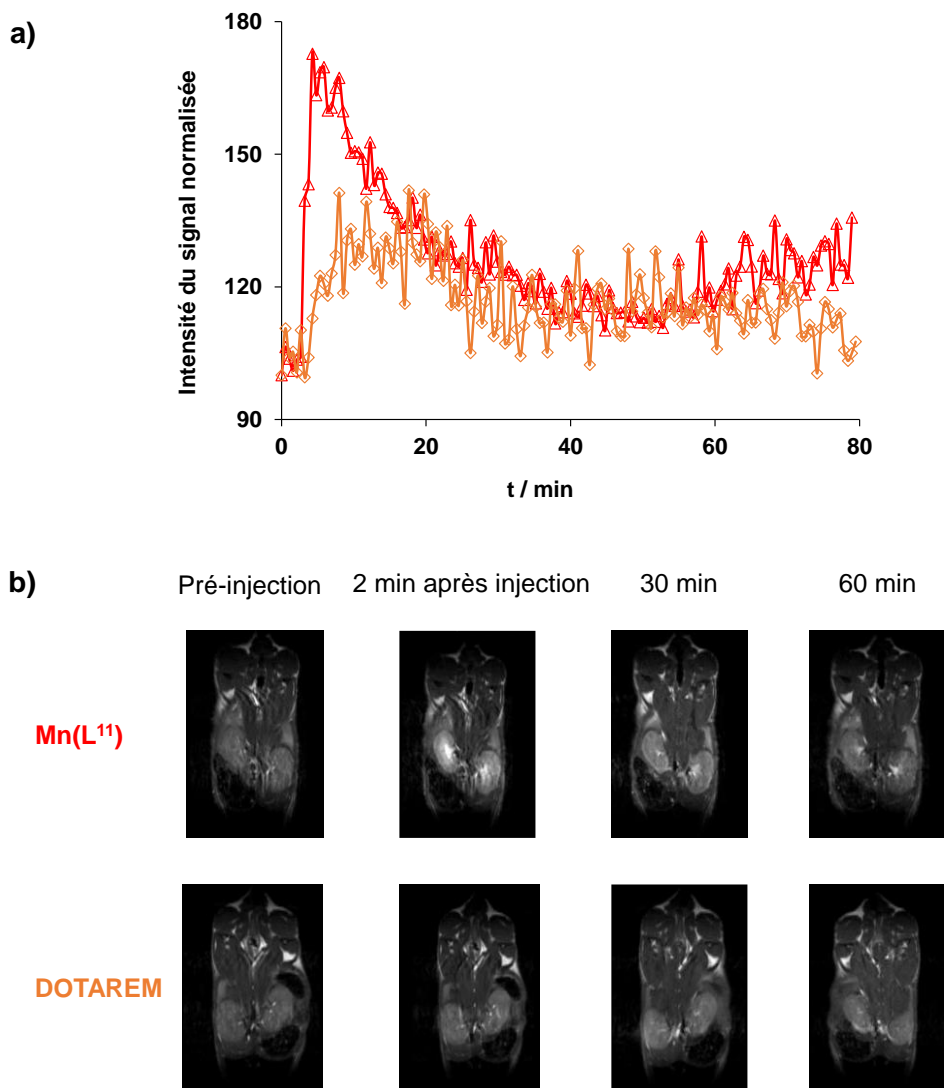


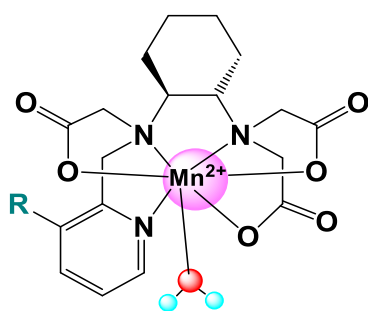
Figure 4.22 : a) Evolution du signal IRM normalisé obtenu au niveau des reins ; b) Images obtenues à différents temps.

Pour déterminer la biodistribution du complexe, nous avons réalisé une étude *ex vivo* en sacrifiant les souris au bout de 24 h après injection. Ensuite, nous avons sélectionné quelques organes, tels que le foie, les poumons, la rate et les reins, pour déterminer leur teneur en Mn^{2+} , après digestion, par le biais de la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS). La tableau 4.8 représente les résultats obtenus.

Etude de ligands de type bispidine sélectifs au Mn(II) vs. le Zn(II)

Tableau 4.8: Teneur tissulaire en Mn²⁺ 24 h après injection de 0,02 mmol/kg de Mn(L¹¹) ; 0,1 mmol/kg de Mn(pyC3A-4), Mn(pyC3A-6) et Mn(pyC3A-10), chez des souris saines déterminée par ICP-MS. La quantité en Mn²⁺ est représentée en nmol.g⁻¹.

	Mn(L ¹¹)	Mn(PyC3A-OH) ³⁹	Mn(PyC3A-OMe) ³⁹	Mn(PyC3A-OBn) ³⁹
poumons	3,3±0,3	4,23	5,14	4,87
foie	20,4±4,0	25,0	24,0	23,3
rate	2,2±0,9	8,21	11,3	9,03
reins	19,6±3,4	35,2	31,8	31,6



R = OH : Mn(PyC3A-OH)

R = O-CH₃ : Mn(PyC3A-OMe)

R =  : Mn(PyC3A-OBn)

En comparant nos résultats à ceux obtenus avec les complexes [Mn(PyC3A-OH)]⁻, [Mn(PyC3A-OMe)]⁻ et [Mn(PyC3A-OBn)]⁻ publiés par l'équipe du Dr. Peter Caravan, nous notons une similarité. Ces complexes ont été étudiés pour évaluer le changement de la polarité sur la biodistribution ; d'ailleurs [Mn(pyC3A-OBn)]⁻ est un candidat pour la détection de tumeurs du foie chez le modèle murin.³⁹ À noter qu'avec ces complexes, le Mn²⁺ exogène est totalement éliminé au bout de 24 h après l'injection. Donc, on peut en déduire que ces résultats *ex vivo* sont en accord avec ceux des études *in vivo* dont nous avons observé une clairance rapide.

Nos résultats viennent enrichir les propriétés intéressantes propres aux complexes de Mn²⁺ basés sur les bispidines. Cependant, pour des études beaucoup plus poussées en IRM, il faudrait fonctionnaliser le ligand, afin de détecter un biomarqueur. Pour améliorer le profil de toxicité, la charge du complexe qui est égal à +1 devrait être diminuer.

Le complexe [Mn(L⁹)]²⁺ qui a une liaison non négligeable avec l'albumine, en diminuant sa charge, pourrait être éventuellement utilisé pour l'angiographie.

Chapitre 4

Conclusion

Les études réalisées dans ce chapitre, plus particulièrement celles de la stabilité des complexes ont révélé une autre facette sans précédent des bispidines.

L^9 et L^{11} sont des bispidines hepta-dentées, alors que la L^{10} est octa-dentée. Tous les trois forment des complexes de Mn^{2+} plus stables que ceux à base de Zn^{2+} . En comparant leur $\log K$, nous notons une différence de 4 à 10 ordres de grandeur, conférant à ces bispidines le statut de seuls ligands connus à ce jour sélectifs au Mn^{2+} vs. le Zn^{2+} avec une telle différence de $\log K$.² Cette sélectivité exceptionnelle est la conséquence de la différence au niveau de la sphère de coordination, octa-coordinée pour le Mn^{2+} et hexa-coordinée pour le Zn^{2+} , comme en témoignent les structures cristallines. Grâce à la haute denticité des ligands et la rigidité du squelette bispidine, la cavité de coordination est trop grande pour le Zn^{2+} alors qu'elle est adaptée à la taille relativement plus grande du Mn^{2+} .

Ces chélates font partie des rares exemples dans lesquels le Mn^{2+} est octa-coordiné.

La haute denticité des ligands renforce la stabilité des complexes de Mn^{2+} , mais les huit atomes donneurs du L^{10} induisent aussi l'absence de molécule d'eau en première sphère de coordination du complexe de Mn^{2+} ($[Mn(L^{10})]^+$). Le changement de la nature de l'atome donneur porté en position N3 (N : pyridine ou O : acétate) impacte légèrement la stabilité, tout en maintenant la sélectivité *vis-à-vis* du Zn^{2+} . Ces résultats thermodynamique vont à l'encontre de l'ordre prédit par la série d'Irving-Williams entre Mn^{2+} et Zn^{2+} . Ils démontrent une nouvelle fois les propriétés de coordination et les caractéristiques physico-chimiques uniques engendrées par des ligands de type bispidine.

$[Mn(L^9)]^{2+}$, $[Mn(L^{10})]^+$ et $[Mn(L^{11})]^+$ ont une très bonne inertie, même si elle est inférieure à celle de $[Mn(HL^1)]$ qui ne se dissocie pas pendant au moins 144 jours à pH 6, alors que dans les mêmes conditions, 20 à 90 jours suffisent pour une décomplexation totale des complexes $[Mn(L^{9-11})]$. Néanmoins, leur inertie est largement suffisante pour des applications biologiques. Malgré la grande différence de stabilité entre les complexes mono-nucléaires de Mn^{2+} et de Zn^{2+} , une transmétallation est possible en présence d'excès de Zn^{2+} , lié à la formation d'un complexe dinucléaire $[Zn_2(L)]$.

Le mécanisme de dissociation de $[Mn(L^9)]^{2+}$ et $[Mn(L^{10})]^+$ est unique. Contrairement aux exemples de la littérature et aux complexes de Mn^{2+} hexa-coordinés précédemment étudiés

Etude de ligands de type bispidine sélectifs au Mn(II) vs. le Zn(II)

comme $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$, la décomplexation est indépendante du pH (dans la gamme étudiée, pH~2-6) et se réalise exclusivement par voie métallo-assistée. Les études cinétiques suggèrent également la coexistence de deux isomères en solution, avec une vitesse de dissociation légèrement différente.

$[\text{Mn}(\text{L}^9)]^{2+}$ et $[\text{Mn}(\text{L}^{11})]^+$ possèdent une très bonne relaxivité pour un complexe monohydraté. L'échange de la molécule d'eau est approximativement deux fois plus rapide que celui du $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$; le mécanisme est dissociatif comme attendu pour un Mn^{2+} octa-coordiné.

Les études IRM *in vivo* réalisées chez des souris saines en injectant $[\text{Mn}(\text{L}^{11})]^+$ illustrent cette bonne efficacité. En effet, avec une dose inférieure de 80 % à celle utilisée en diagnostic clinique (pour le Gd^{3+}), nous observons un bon signal IRM qui est nettement supérieur à celui observé avec le DOTAREM, à dose identique. $[\text{Mn}(\text{L}^{11})]^+$ est excrété rapidement par voie rénale et on ne détecte aucun résidu du métal dans les tissus au bout de 24 h.

$[\text{Mn}(\text{L}^9)]^{2+}$ a une affinité non négligeable à l'albumine qui pourrait être mise au profit pour l'angiographie par exemple, après avoir diminuée la charge en hydrolysant les fonctions esters afin d'améliorer son profil de toxicité.

En revanche pour $[\text{Mn}(\text{L}^{10})]^+$, très stable et inerte mais sans molécule d'eau en première sphère de coordination, une utilisation en TEP après radiomarquage avec $^{52}\text{Mn}^{2+}$ pourrait être très intéressante.

Références

1. Irving, H.; Williams, R. J. P., Order of Stability of Metal Complexes. *Nature* **1948**, *162* (4123), 746-747.
2. IUPAC For metal-complex stability constants or speciation in any field of quantitative science <http://www.acadsoft.co.uk/>.
3. Comba, P.; Kerscher, M.; Rück, K.; Starke, M., Bispidines for radiopharmaceuticals. *Dalton Transactions* **2018**, *47* (28), 9202-9220.
4. Comba, P.; Kerscher, M.; Merz, M.; Müller, V.; Pritzkow, H.; Remenyi, R.; Schiek, W.; Xiong, Y., Structural Variation in Transition-Metal Bispidine Compounds. *Chemistry – A European Journal* **2002**, *8* (24), 5750-5760.
5. Bleiholder, C.; Börzel, H.; Comba, P.; Ferrari, R.; Heydt, M.; Kerscher, M.; Kuwata, S.; Laurency, G.; Lawrance, G. A.; Lienke, A.; Martin, B.; Merz, M.; Nuber, B.; Pritzkow, H., Coordination Chemistry of a New Rigid, Hexadentate Bispidine-Based Bis(amine)tetrakis(pyridine) Ligand. *Inorganic Chemistry* **2005**, *44* (22), 8145-8155.
6. Comba, P.; Rudolf, H.; Wadepohl, H., Synthesis and transition metal coordination chemistry of a novel hexadentate bispidine ligand. *Dalton Transactions* **2015**, *44* (6), 2724-2736.
7. S. Lacerda, D. N., É. Tóth, *Manganese Complexes as Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging*. A. Sigel, E. Freisinger, R. K. O. Sigel ed.; 2021; Vol. 22.
8. Katarina Neupert-Laves, M. D., Crystal Structure of Metal-Ion Complexes with neutral noncyclic Ionophores. *HELVETICA CHIMICA ACTA* **1977**, *60* (6), 1861-1871.
9. Reid, H. O. N.; Kahwa, I. A.; White, A. J. P.; Williams, D. J., Intense Photosensitized Emission from Stoichiometric Compounds Featuring Mn²⁺ in Seven- and Eightfold Coordination Environments. *Inorganic Chemistry* **1998**, *37* (15), 3868-3873.
10. Dongbin Dang, Y. B., Chunying Duan, Crystal Structure and Magnetic Properties of a Novel Octa-coordinated Manganese(II) Complex. *J Chem Crystallograp* **2008**, *38* (7), 557-560.
11. Wang, S.; Westmoreland, T. D., Correlation of Relaxivity with Coordination Number in Six-, Seven-, and Eight-Coordinate Mn(II) Complexes of Pendant-Arm Cyclen Derivatives. *Inorganic Chemistry* **2009**, *48* (2), 719-727.
12. Dube, K. S.; Harrop, T. C., Structure and properties of an eight-coordinate Mn(ii) complex that demonstrates a high water relaxivity. *Dalton Transactions* **2011**, *40* (29), 7496-7498.
13. Comba, P.; Starke, M.; Wadepohl, H., Optimization of Hexadentate Bispidine Ligands as Chelators for ⁶⁴CuII PET Imaging. *ChemPlusChem* **2018**, *83* (7), 597-604.
14. Kolanowski, J. L.; Jeanneau, E.; Steinhoff, R.; Hasserodt, J., Bispidine Platform Grants Full Control over Magnetic State of Ferrous Chelates in Water. *Chemistry – A European Journal* **2013**, *19* (27), 8839-8849.
15. Comba, P.; Jermilova, U.; Orvig, C.; Patrick, B. O.; Ramogida, C. F.; Rück, K.; Schneider, C.; Starke, M., Octadentate Picolinic Acid-Based Bispidine Ligand for Radiometal Ions. *Chemistry – A European Journal* **2017**, *23* (63), 15945-15956.
16. Malikidogo, K. P.; Martin, H.; Bonnet, C. S., From Zn(II) to Cu(II) Detection by MRI Using Metal-Based Probes: Current Progress and Challenges. *Pharmaceuticals* **2020**, *13* (12).
17. Toth, E.; Brucher, E.; Lazar, I.; Toth, I., Kinetics of Formation and Dissociation of Lanthanide(III)-DOTA Complexes. *Inorganic Chemistry* **1994**, *33* (18), 4070-4076.

Etude de ligands de type bispidine sélectifs au Mn(II) vs. le Zn(II)

18. Botár, R.; Molnár, E.; Trencsényi, G.; Kiss, J.; Kálmán, F. K.; Tircsó, G., Stable and Inert Mn(II)-Based and pH-Responsive Contrast Agents. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (4), 1662-1666.
19. Norrehed, S.; Erdélyi, M.; Light, M. E.; Gogoll, A., Protonation-triggered conformational modulation of an N,N'-dialkylbispidine: first observation of the elusive boat–boat conformer. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2013**, *11* (37), 6292-6299.
20. Born, K.; Comba, P.; Ferrari, R.; Lawrance, G. A.; Wadepohl, H., Stability Constants: A New Twist in Transition Metal Bispidine Chemistry. *Inorganic Chemistry* **2007**, *46* (2), 458-464.
21. Comba, P.; Grimm, L.; Orvig, C.; Rück, K.; Wadepohl, H., Synthesis and Coordination Chemistry of Hexadentate Picolinic Acid Based Bispidine Ligands. *Inorganic Chemistry* **2016**, *55* (24), 12531-12543.
22. Gillet, R.; Roux, A.; Brandel, J.; Huclier-Markai, S.; Camerel, F.; Jeannin, O.; Nonat, A. M.; Charbonnière, L. J., A Bispidol Chelator with a Phosphonate Pendant Arm: Synthesis, Cu(II) Complexation, and ⁶⁴Cu Labeling. *Inorganic Chemistry* **2017**, *56* (19), 11738-11752.
23. 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* (6), 2858-2872.
24. Botar, R.; Molnar, E.; Trencsenyi, G.; Kiss, J.; Kalman, F. K.; Tircso, G., Stable and Inert Mn(II)-Based and pH-Responsive Contrast Agents. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (4), 1662-1666.
25. Garda, Z.; Molnár, E.; Kálmán, F. K.; Botár, R.; Nagy, V.; Baranyai, Z.; Brücher, E.; Kovács, Z.; Tóth, I.; Tircsó, G., Effect of the Nature of Donor Atoms on the Thermodynamic, Kinetic and Relaxation Properties of Mn(II) Complexes Formed With Some Trisubstituted 12-Membered Macrocyclic Ligands. *Frontiers in Chemistry* **2018**, *6* (232).
26. Laine, S.; Bonnet, C. S.; Kálmán, F. K.; Garda, Z.; Pallier, A.; Caillé, F.; Suzenet, F.; Tircsó, G.; Tóth, É., Mn²⁺ complexes of open-chain ligands with a pyridine backbone: less donor atoms lead to higher kinetic inertness. *New Journal of Chemistry* **2018**, *42* (10), 8012-8020.
27. Salo, T. M.; Helaja, J.; Koskinen, A. M. P., Development of Dpa-based imidazole zinc anion receptors. *Tetrahedron Letters* **2006**, *47* (17), 2977-2980.
28. Lee, N.; Ly, N. H.; Kim, J. S.; Jung, H. S.; Joo, S.-W., A selective triarylmethine-based spectroscopic probe for Zn²⁺ ion monitoring. *Dyes and Pigments* **2019**, *171*, 107721.
29. Sarka, L.; Burai, L.; Brucher, E., The rates of the exchange reactions between GdDTPA and the endogenous ions Cu²⁺ and Zn²⁺: A kinetic model for the prediction of the in vivo stability of GdDTPA, used as a contrast agent in Magnetic Resonance Imaging. *Chemistry - A European Journal* **2000**, *6*, 719-724.
30. Gale, E. M.; Atanasova, I. P.; Blasi, F.; Ay, I.; Caravan, P., A Manganese Alternative to Gadolinium for MRI Contrast. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (49), 15548-15557.
31. Kalman, F. K.; Tircso, G., Kinetic Inertness of the Mn²⁺ Complexes Formed with AAZTA and Some Open-Chain EDTA Derivatives. *Inorganic Chemistry* **2012**, *51* (19), 10065-10067.
32. Drahos, B.; Pniok, M.; Havlickova, J.; Kotek, J.; Cisarova, I.; Hermann, P.; Lukes, I.; Toth, E., Mn²⁺ complexes of 1-oxa-4,7-diazacyclononane based ligands with acetic, phosphonic and phosphinic acid pendant arms: Stability and relaxation studies. *Dalton Transactions* **2011**, *40* (39), 10131-10146.
33. Berki, T. R.; Martinelli, J.; Tei, L.; Willcock, H.; Butler, S. J., Polymerizable Gd(III) building blocks for the synthesis of high relaxivity macromolecular MRI contrast agents. *Chemical Science* **2021**, *12* (11), 3999-4013.
34. Gale, E. M.; Zhu, J.; Caravan, P., Direct Measurement of the Mn(II) Hydration State in Metal Complexes and Metalloproteins through O-17 NMR Line Widths. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (49), 18600-18608.

Chapitre 4

35. Kramer, H.; Runge, V. M.; Naul, L. G.; Loynachan, A. T.; Reiser, M. F.; Wintersperger, B. J., Brain MRI With Single-Dose (0.1 mmol/kg) Gadobutrol at 1.5 T and 3 T: Comparison With 0.15 mmol/kg Gadoterate Meglumine. *American Journal of Roentgenology* **2010**, *194* (5), 1337-1342.
36. Silver, N. C.; Good, C. D.; Barker, G. J.; MacManus, D. G.; Thompson, A. J.; Moseley, I. F.; McDonald, W. I.; Miller, D. H., Sensitivity of contrast enhanced MRI in multiple sclerosis. Effects of gadolinium dose, magnetization transfer contrast and delayed imaging. *Brain* **1997**, *120* (7), 1149-1161.
37. Wagner, A.; Mahrholdt, H.; Thomson, L.; Hager, S.; Meinhardt, G.; Rehwald, W.; Parker, M.; Shah, D.; Sechtem, U.; Kim, R. J.; Judd, R. M., Effects of Time, Dose, and Inversion Time for Acute Myocardial Infarct Size Measurements Based on Magnetic Resonance Imaging-Delayed Contrast Enhancement. *Journal of the American College of Cardiology* **2006**, *47* (10), 2027-2033.
38. Alger, J. R.; Schaewe, T. J.; Lai, T. C.; Frew, A. J.; Vespa, P. M.; Etchepare, M.; Liebeskind, D. S.; Saver, J. L.; Kidwell, S. C., Contrast agent dose effects in cerebral dynamic susceptibility contrast magnetic resonance perfusion imaging. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* **2009**, *29* (1), 52-64.
39. Wang, J.; Wang, H.; Ramsay, I. A.; Erstad, D. J.; Fuchs, B. C.; Tanabe, K. K.; Caravan, P.; Gale, E. M., Manganese-Based Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging of Liver Tumors: Structure-Activity Relationships and Lead Candidate Evaluation. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (19), 8811-8824.

Chapitre 5 : Conclusions générales et perspectives

Conclusions générales et perspectives

Depuis l'identification d'un lien de causalité entre les injections de complexes de Gd^{3+} pour des examens IRM et la maladie mortelle de fibrose néphrogénique systémique,¹⁻² beaucoup de recherches ont été menées pour développer des agents de contraste plus sûrs et biocompatibles. Dans ce contexte, les chélates de Mn^{2+} représentent les meilleurs alternatives. Le Mn^{2+} possède des propriétés de relaxation similaires à celles du Gd^{3+} , et le manganèse est un métal de transition essentiel à la vie. De plus, le Mn^{2+} est le seul métal qui offre la possibilité de faire une imagerie bimodale (IRM / TEP), qui couple la haute sensibilité de la TEP et la très bonne résolution spatiale de l'IRM. Néanmoins, afin d'éviter toute toxicité du métal aux concentrations nécessaires en IRM, il est nécessaire de chélater le Mn^{2+} et le complexe doit être stable et inerte, il doit également permettre, pour une bonne efficacité de relaxation, la coordination d'une molécule d'eau en première sphère.

En raison de son rayon plus petit que celui du Gd^{3+} ($r_{Gd^{3+}} = 1,31 \times r_{Mn^{2+}}$) et le manque d'énergie de stabilisation du champ cristallin, le Mn^{2+} forme des complexes peu stables et labiles. De plus, les complexes de Zn^{2+} , dont ce dernier (Zn^{2+}) est le compétiteur principal du Mn^{2+} en milieu biologique, sont plus stables, comme prédit par la série d'Irving-Williams.³ Dans ce contexte, l'objectif principal de cette thèse a été la conception de complexes de manganèse (Mn^{2+}) hautement inertes, stables et efficaces pour des applications en imagerie par résonance magnétique, mais également en imagerie bimodale (IRM/TEP). La très grande rigidité, la pré-organisation et la versatilité de coordination des ligands de type bispidine sont des atouts majeurs pour atteindre ces objectifs.

En collaboration avec l'équipe des Dr. Loïc Charbonnière et Dr. Aline Nonat à l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, CNRS, Strasbourg, France, et l'équipe du Pr. Peter Comba de l'Université d'Heidelberg, Allemagne, spécialisées dans la conception de ligands de type bispidine, nous avons étudié en tout onze complexes de Mn^{2+} . Nous avons caractérisé leur stabilité et leur inertie, ainsi que les propriétés de relaxation. Pour certains, nous avons réalisé des études *in vivo* en IRM, et de biodistribution *ex vivo* (ICP-OES/MS) chez des souris saines. Grâce à la production de l'isotope ^{52}Mn pour la première fois en France (CEMHTI, CNRS, Orléans), nous avons réussi à radiomarquer la bispidine L^1 et son dérivé RGD (L^1 -RGD).

Dans un premier temps, les études réalisées sur $[Mn(HL^1)]$ dans le Chapitre 2 ont révélé une inertie cinétique inédite. En effet, $[Mn(HL^1)]$ est le complexe de Mn^{2+} hydraté le plus inerte connu à ce jour, sans aucune dissociation détectable pendant au moins cinq mois dans des conditions standards (pH 6, en présence de 50 équivalents de Zn^{2+} , 37 °C). Dans ces mêmes

Chapitre 5

conditions, le complexe de Mn^{2+} considéré comme le plus inerte jusque-là possède un temps demi-vie de dissociation de 54,4 h.⁴

Cette inertie exceptionnelle est accompagnée d'une bonne efficacité de relaxation pour un complexe de Mn^{2+} de petite taille ($r_1 = 4,14 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 60 MHz, 25 °C), comparable à celle des agents de contraste à base de Gd^{3+} .⁵ Cette bonne relaxivité est probablement due à la contribution non-négligeable de la seconde sphère de coordination, grâce à la présence de deux carboxylates et une fonction amine dont les atomes donneurs sont non-coordinés au métal.

Les études RMN réalisées sur le complexe $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ ont été très informatives malgré le fort paramagnétisme du Mn^{2+} , et elles nous ont permis de démontrer qu'à pH physiologique, $\text{Mn}(\text{HL}^1)$ existe sous deux formes distinctes caractérisées par une rigidité différente de la chaîne lysine.

Des images IRM *in vivo* de bonne qualité ont pu être enregistrées chez des souris saines, en utilisant une dose de $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ 40 % inférieure à la dose habituelle de Gd^{3+} en diagnostic clinique.⁶⁻⁹ Nous avons observé une clairance rénale, et un temps de demi-vie de 21 min dans la circulation sanguine. Une étude de biodistribution *ex vivo* chez la souris (ICP-OES) a été menée afin d'évaluer la teneur en Mn dans les organes d'intérêt au bout d'une heure trente minutes. Les résultats confortent une élimination rapide du complexe, sans aucune rétention détectée dans les organes.

Nous avons réussi à radiomarquer la bispidine L^1 avec du $^{52}\text{Mn}^{2+}$, avec un rendement de 100%, en utilisant un ratio $^{52}\text{Mn}^{2+}/\text{L}^1 : 1/10$. Le radiocomplexe possède une bonne stabilité dans différents milieux biologiquement pertinents. Un dérivé RGD du L^1 a été également radiomarqué au $^{52}\text{Mn}^{2+}$ et le radiocomplexe injecté à des souris porteuses de tumeurs colorectaux orthotopiques. La biodistribution *ex vivo* a montré une bonne fixation tumorale du complexe vis-à-vis des autres organes, plus particulièrement à l'intestin.

Dans le Chapitre 3, notre objectif était d'établir des relations entre la structure des ligands et les propriétés physico-chimiques des complexes de Mn^{2+} . Pour cela, huit ligands de type bispidine penta ou hexa-dentés (L^{1-8}) ont été comparés. Dans un premier temps, les études RMN et potentiométriques ont démontré que les bispidines qui portent un groupement méthyle en position N3 ($\text{L}^1, \text{L}^2, \text{L}^3, \text{L}^6, \text{L}^7$ et L^8) ont un comportement très différent des autres portant une fonction acétate sur cette même position (L^4, L^5). Avec les ligands du premier groupe, un seul des deux hétéroatomes du bicyclic peut être protoné ($\text{N}3^+-\text{H}---\text{N}7$). Ils ont une conformation

Conclusions générales et perspectives

chaise-chaise, ce qui engendra la formation d'une « cage bicyclique », bien adaptée à la complexation des métaux.

En revanche, les bispidines L^4 et L^5 peuvent être diprotonées sur le bicyclic ($N3^+-H H-N7^+$) et elles sont en conformation bateau-chaise, dénuées de « cage bicyclique » pour la coordination des métaux, comme illustré sur la figure ci-dessous. Ces résultats soulignent à quel point de petits changements structuraux à travers la fonctionnalisation de certains sites engendrent d'importantes variations conformationnelles.

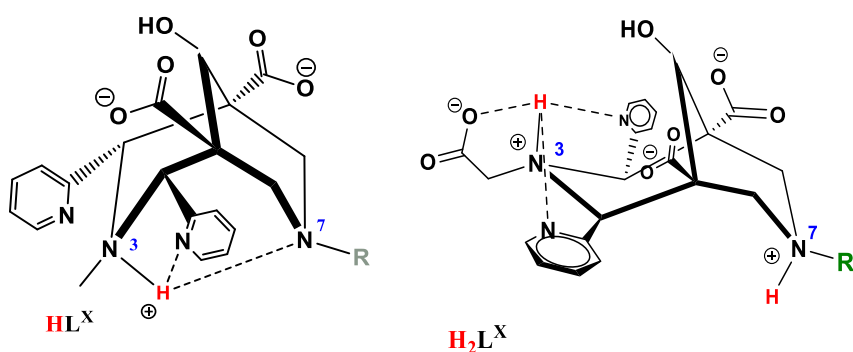


Illustration des deux conformations; avec $X = 1, 2, 3, 6, 7$ et 8 pour HL^X ; $X = 4$ et 5 pour H_2L^X .

Les ligands en conformation bateau-chaise se complexent très rapidement avec le Mn^{2+} ; en revanche, pour ceux en conformation chaise-chaise la complexation est plus ou moins lente en fonction de la nature du groupement qui se trouve en position α du carboxylate en position N7. L'étape déterminante de la cinétique correspond à la déprotonation de l'amine du bicyclic.

Les études de cinétique de dissociation démontrent le rôle primordial de la cavité de coordination bicyclique sur la très haute inertie observée avec les complexes de Mn^{2+} des ligands en conformation chaise-chaise. Ceci est attesté par la comparaison entre $[Mn(L^3)]^-$ et $[Mn(HL^4)]$, isomères de position, caractérisée par une dissociation 3-4 ordres de grandeur plus rapide pour $[Mn(HL^4)]$ que $[Mn(L^3)]^-$. Ces études ont révélé aussi le rôle non négligeable de l'amine primaire de la lysine combiné à celui des carboxylates portés par le « noyau bicyclique » pour renforcer l'inertie. En conséquence, $[Mn(HL^1)]$ reste le complexe le plus inerte dans cette série. La dissociation de tous ces complexes se réalise essentiellement par catalyse acide.

Un point faible des complexes de Mn^{2+} basés sur les bispidines L^1-L^8 est leur stabilité modeste.

Chapitre 5

Par la suite, nous nous sommes intéressés aux bispidines hepta- (L^9 et L^{11}), et octa-dentées (L^{10}) dans l'objectif d'augmenter la stabilité des complexes de Mn^{2+} , et d'atteindre une sélectivité vis-à-vis du Zn^{2+} . Nos études décrites dans le Chapitre 4 ont révélé les premiers exemples de ligands qui forment des complexes de Mn^{2+} plus stables que ceux de Zn^{2+} , avec une différence de $\log K$ de 4 à 10 ordres de grandeur.¹⁰ Ces complexes de Mn^{2+} font partie des rares exemples dont le Mn^{2+} est octa-coordiné. Cette sélectivité impressionnante est la conséquence directe des sphères de coordination différentes - aussi bien à l'état solide qu'en solution - pour le Zn^{2+} et le Mn^{2+} , le premier étant plus petit et ne pouvant accommoder que six atomes donneurs, contrairement aux 8 pour le Mn^{2+} .

Cependant, l'inertie de ces chélates de Mn^{2+} octa-coordinés est relativement moins bonne par rapport à celle de $[Mn(HL^1)]$, car leur dissociation totale se réalise entre 20 et 90 jours (à pH 6, en présence de 25 équivalents de Zn^{2+} , 37°C). Le mécanisme de dissociation est très différent de celui des complexes $[Mn(L^{1-8})]$ et plus généralement de ce qui est connu à ce jour sur les complexes métalliques. En effet, seule la voie métallo-assistée est importante, alors que la dissociation reste complètement indépendante du pH. Par ailleurs, les titrages potentiométriques en présence de deux équivalents de Zn^{2+} révèlent la formation d'un complexe de Zn^{2+} dinucléaire.

Nous notons également une bonne relaxivité pour $[Mn(L^9)]^{2+}$ et $[Mn(L^{11})]^+$, avec des valeurs respectives de 4,87 et 4,47 $mM^{-1}.s^{-1}$, à 60 MHz, 25°C. Cette très bonne efficacité IRM est illustrée à travers les études IRM *in vivo* réalisées chez la souris, en injectant une dose inférieure de 80 % à celle utilisée en diagnostic clinique.

L'ensemble de ces travaux a démontré les propriétés attrayantes des complexes de Mn^{2+} basés sur des bispidines. A partir de ces études, plusieurs pistes sont envisageables pour valoriser certains de ces complexes, tel que $[Mn(HL^1)]$ par la fonctionnalisation de l'amine de la chaîne lysine par une unité de ciblage spécifique à une pathologie donnée, comme un anticorps, dans le cas du radiocomplexe $[^{52}Mn(HL^1)]$. En effet, la demi-vie de $t_{1/2} = 5,6$ j du ^{52}Mn est particulièrement bien adaptée à la visualisation en TEP des phénomènes biologiques lents, comme la biodistribution des anticorps. Vue sa haute inertie en présence du Zn^{2+} , l'amine peut aussi être fonctionnalisée pour générer une unité complexante du Zn^{2+} , par référence au dipicolylamine (DPA), en ouvrant la voie vers la détection IRM du Zn^{2+} . Ceci peut s'inscrire dans une approche de diagnostic précoce, par le biais de l'IRM, de certaines pathologies telles

Conclusions générales et perspectives

que les maladies neurodégénératives, le diabète, le cancer, etc, qui engendrent la perturbation de l'homéostasie du Zn^{2+} .¹¹

L'augmentation de la lipophilie du complexe $[Mn(HL^1)]$ en greffant au ligand un groupement hydrophobe, tels que le benzothiazole aniline (BTA), l'éthoxybenzyl (EOB) permettrait de réaliser des études pour la détection de tumeurs hépatiques.

Dans la classe des ligands hepta-dentés, le remplacement des fonctions esters par des acides pourrait apporter une meilleure solubilité et biocompatibilité aux complexes, et éventuellement une meilleure relaxivité.

Sur un plan plus fondamental, une meilleure compréhension des mécanismes de dissociation de ces complexes semble très intéressante. Pour cela, la dissociation en présence du Cu^{2+} , plus rapide qu'en présence du Zn^{2+} , devrait être mieux explorée.

Globalement, la famille des bispidines promet encore la découverte de nombreux phénomènes intrigants en chimie de coordination.

Références

1. Gianolio, E.; Bardini, P.; Arena, F.; Stefania, R.; Di Gregorio, E.; Iani, R.; Aime, S., Gadolinium Retention in the Rat Brain: Assessment of the Amounts of Insoluble Gadolinium-containing Species and Intact Gadolinium Complexes after Repeated Administration of Gadolinium-based Contrast Agents. *Radiology* **2017**, *285* (3), 839-849.
2. Agarwal, R.; Brunelli, S. M.; Williams, K.; Mitchell, M. D.; Feldman, H. I.; Umscheid, C. A., Gadolinium-based contrast agents and nephrogenic systemic fibrosis: a systematic review and meta-analysis. *Nephrology Dialysis Transplantation* **2008**, *24* (3), 856-863.
3. Irving, H.; Williams, R. J. P., Order of Stability of Metal Complexes. *Nature* **1948**, *162* (4123), 746-747.
4. Botar, R.; Molnar, E.; Trencsenyi, G.; Kiss, J.; Kalman, F. K.; Tircso, G., Stable and Inert Mn(II)-Based and pH-Responsive Contrast Agents. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (4), 1662-1666.
5. Berki, T. R.; Martinelli, J.; Tei, L.; Willcock, H.; Butler, S. J., Polymerizable Gd(III) building blocks for the synthesis of high relaxivity macromolecular MRI contrast agents. *Chemical Science* **2021**, *12* (11), 3999-4013.
6. Kramer, H.; Runge, V. M.; Naul, L. G.; Loynachan, A. T.; Reiser, M. F.; Wintersperger, B. J., Brain MRI With Single-Dose (0.1 mmol/kg) Gadobutrol at 1.5 T and 3 T: Comparison With 0.15 mmol/kg Gadoterate Meglumine. *American Journal of Roentgenology* **2010**, *194* (5), 1337-1342.
7. Silver, N. C.; Good, C. D.; Barker, G. J.; MacManus, D. G.; Thompson, A. J.; Moseley, I. F.; McDonald, W. I.; Miller, D. H., Sensitivity of contrast enhanced MRI in multiple sclerosis. Effects of gadolinium dose, magnetization transfer contrast and delayed imaging. *Brain* **1997**, *120* (7), 1149-1161.
8. Wagner, A.; Mahrholdt, H.; Thomson, L.; Hager, S.; Meinhardt, G.; Rehwald, W.; Parker, M.; Shah, D.; Sechtem, U.; Kim, R. J.; Judd, R. M., Effects of Time, Dose, and Inversion Time for Acute Myocardial Infarct Size Measurements Based on Magnetic Resonance Imaging-Delayed Contrast Enhancement. *Journal of the American College of Cardiology* **2006**, *47* (10), 2027-2033.
9. Alger, J. R.; Schaewe, T. J.; Lai, T. C.; Frew, A. J.; Vespa, P. M.; Etchepare, M.; Liebeskind, D. S.; Saver, J. L.; Kidwell, S. C., Contrast agent dose effects in cerebral dynamic susceptibility contrast magnetic resonance perfusion imaging. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* **2009**, *29* (1), 52-64.
10. IUPAC For metal-complex stability constants or speciation in any field of quantitative science <http://www.acadsoft.co.uk/>.
11. Malikidogo, K. P.; Martin, H.; Bonnet, C. S., From Zn(II) to Cu(II) Detection by MRI Using Metal-Based Probes: Current Progress and Challenges. *Pharmaceuticals* **2020**, *13* (12).

Chapitre 6 : Partie expérimentale

Partie expérimentale

1. Solvents and reagents

All commercial reagents and solvents come from suppliers such as Sigma-Aldrich, Carlo Erba, Fisher Scientific, Alfa-Aeser and TCI Chemicals and were used without further purifications.

2. Solution preparation

Ligand and MnCl_2 solutions were prepared in MilliQ water ($\rho < 18\text{M}\Omega$).

Ligand concentrations were determined by adding an excess of zinc solution to the ligand solution and titrating the metal excess with standardised $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ in urotropine buffer (pH 5.6–5.8) in the presence of Xylenol Orange as an indicator.

The concentrations of the metal solutions were determined by complexometric titrations with standardised $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$.

Manganese complexes were prepared by mixing 1 eq. of ligand, with 1 eq. of MnCl_2 , and the pH was adjusted to 7.4 either in a buffered solution or by adding NaOH or HCl to the solution and the samples were heated at 60 °C for 30 min. The absence of free Mn^{2+} was checked by the Xylenol Orange test. The concentration of Mn^{2+} -containing samples was checked by ICP-OES and/or bulk magnetic susceptibility (BMS) measurements.

3. Synthesis of the ligands

The synthesis of the bispidine ligands L^1 to L^8 was performed at the Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC) (CNRS Strasbourg) by Maryame Sy, under the supervision of Dr. Loïc Charbonnière and Dr. Aline Nonat, according to already published procedure¹ or procedures which will be described in the PhD thesis of Maryame Sy (under preparation).

The bispidine ligands L^9 to L^{11} were synthesised by Dr. Patrick Cieslik at the University of Heidelberg (Germany) under the supervision of Prof. Peter Comba, according to already published procedure.²⁻⁵

4. Potentiometric titrations

Carbonate-free 0.1 M NaOH and 0.1 M HCl were prepared from Fisher Chemicals concentrates. Potentiometric titrations were performed in 0.15 M aqueous KCl or NaCl under nitrogen atmosphere and the temperature was controlled at 25 ± 0.1 °C with a circulating water bath. The p[H] ($p[H] = -\log[H^+]$, concentration in molarity) was measured in each titration with a combined pH glass electrode (Metrohm) filled with 3 M KCl. The titrant addition was automated by use of a 702 SM titrino system (Metrohm). The electrode was calibrated in hydrogen ion concentration by titration of HCl with KOH in 0.1 M electrolyte solution.⁶ A plot of potential versus p[H] allows the determination of the electrode standard potential (E°) and the slope factor (f). Continuous potentiometric titrations with 0.1 M NaOH were conducted on aqueous solutions containing between 1.4 and 2 mM of ligand in 0.15 M NaCl (all ligands but L^1) or KCl (L^1) ($V_0 = 5$ mL), with 2- or 5-minutes waiting time between successive points. The titrations of the metal complexes were performed with the same ligand solution containing 1 equivalent of the metal cation. In certain cases, the waiting time was longer and adapted to the time needed to reach equilibrium. For the Mn^{2+} complex of L^2 , a manual titration was carried out between pH 2 and 6, with 20 minutes waiting time between successive points. To assess the stability of the dinuclear Zn_2L complexes (L^9 , L^{10} , L^{11}), titrations were carried out in the presence of two equivalents of the metal.

Batch samples (0.5 mL) were prepared at 1:1 M:L ratios (between 1.4 and 2 mM, 0.15 M NaCl or KCl). The samples were kept at 25°C until the equilibrium state was reached (2 days at pH 2.22 and ~ 5 hours at pH 6.5 for $L^{9,11}$; for L^3 : 1 days at pH 2.5 and ~ 2 hours at pH 6.5; and for L^1 , L^6 : 7 days at pH 2.5 and ~ 10 hours at pH 6.5). This was verified by monitoring the stabilization of the relaxivity and pH values in the samples over time.

Experimental potentiometric data were refined using the computer program Hyperquad 2008.⁷ All equilibrium constants are concentration quotients rather than activities and are defined as:

$$K_{HmMmLl} = \frac{[M_m L_l H_h]}{[M]^m [L]^l [H]^h}$$

The ionic product of water under the experimental conditions is $pK_w = 13.77$.⁸ Fixed values were used for pK_w , ligand acidity constants and total concentrations of metal, ligand and acid. All values and errors (one standard deviation) reported are at least the average of three independent experiments.

Partie expérimentale

Low solubility of L^9 in the basic region ($\text{pH} > 9$) prevented the determination of its first protonation constant; a lower limit for $\log K_{H1}$ of the ligand was therefore estimated from the first protonation constant determined for the pre-complex $[\text{Mn}(\text{HL}^9)^*]^{3+}$ (see chapter 4), corresponding to a tertiary amine.

For $[\text{Mn}(\text{L}^{10})]^+$ the stability was too high to be assessed by pH-potentiometry; it was determined by relaxometric titration.

For the potentiometric titration of the $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ complex in the presence of 1 equivalent of Zn^{2+} , the $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ complex is prepared at pH 7 ($c_{\text{Mn}(\text{HL}^1)} = 1.4 \text{ mM}$), then 1 eq of Zn^{2+} is added. After stabilization of the pH, the manual titration between pH 3 and 10 was performed.

5. Relaxometric titrations

While pH-potentiometric titrations represent the most standard technique to assess the stability of metal complexes, for paramagnetic metals such as Mn^{2+} , pH dependent proton relaxivity measurements can also allow for following complex formation and determining conditional complex stability constants. By using the ligand protonation constants, they can be then converted to thermodynamic stability constants.

Longitudinal and transverse proton relaxivities, respectively, were measured in equilibrated $[\text{Mn}(\text{L}^9)]^{2+}$, $[\text{Mn}(\text{L}^{10})]^+$ and $[\text{Mn}(\text{L}^{11})]^+$ batch samples at $c_{\text{Mn}(\text{L})} = 1.4 \text{ mM}$ concentration between $c_{\text{HCl}} = 0.09 \text{ M}$ and pH 11 for $[\text{Mn}(\text{L}^9)]^{2+}$, and $c_{\text{HCl}} = 0.8 \text{ M}$ and pH 11 for $[\text{Mn}(\text{L}^{10,11})]^+$ at 25°C and 60 MHz on a Bruker Minispec relaxometer.

We have fitted the pH dependent relaxivities measured in batch samples of $[\text{Mn}(\text{L}^9)]^{2+}$, $[\text{Mn}(\text{L}^{10})]^+$ and $[\text{Mn}(\text{L}^{11})]^+$ to calculate the thermodynamic stability constants (see Chapter 4). The fit of the relaxivities vs. H^+ concentration to yield the stability constant was performed using Visualiseur/Optimiseur (F. Yerly, VISUALISEUR 2.3.5, Switzerland, 1999.; F. Yerly, OPTIMISEUR 2.3.5, Switzerland, 1999) running on a MATLAB 8.3.0 (R2014a) platform. Errors indicated represent one standard deviation.

6. Dissociation kinetic studies

The inertness of the $[\text{Mn}(\text{L})]$ complexes studied in Chapters 2 and 3 was assessed at 37 °C and in 0.1 M KCl, via transmetallation studies of $[\text{Mn}(\text{L})]$ (1 mM) complexes with Zn^{2+} at pH 6.06 (0.030 M MES buffer, in the presence of a 10- and 50-fold excess of the Zn^{2+} exchanger), and at pH 3.13 (0.050 M KH phthalate buffer), pH 3.75 and pH 4.16 (0.03 M dimethyl-piperazine (DMP)) and pH 5.07 (0.030 M N-methylpiperazine (NMP)), in the presence of a 50-fold excess of Zn^{2+} .

For the $[\text{Mn}(\text{L})]$ complexes (1.4 mM) studied in Chapter 4, the kinetic inertness was assessed at pH 6.06 (0.035 M MES buffer, in the presence of a 25-fold Zn^{2+} excess).

The excess of the exchanging metal ion guarantees the pseudo-first order conditions. During the duration of the experiments (up to 5 months for $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$), the samples were stored in a thermostat bath at 37 °C between the relaxivity measurements. The pH was checked for each sample at the end of the kinetic measurements to confirm that it remained stable during the experiment. $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ dissociation was also followed at higher acidities (0.01– 1 M), without Zn^{2+} (25 °C, I = 1 M KCl + HCl). Transmetallation reactions were also carried out at different Zn^{2+} concentration (between 14 and 70 mM) for the Mn^{2+} complexes of L^{9-11} to assess their dependence on Zn^{2+} . The same experiment was also carried out in the presence of Cu^{2+} with the $[\text{Mn}(\text{L}^9)]^{2+}$.

In all cases, the reactions were followed by measuring the proton relaxation rate ($1/T_1$ or $1/T_2$) of water at 60 MHz on a Bruker Minispec relaxometer. The analysis of the experimental data was performed using a Visualizer / Optimizer running on a MATLAB 8.3.0 (R2014a) platform.

7. Relaxometric measurements

The proton NMRD profiles of the Mn^{2+} complexes were recorded in aqueous solution ($c_{\text{Mn}(\text{ligand})} = 1.6, 1.8, 1.4, 1.9, 1.2, 1.3, 1.5$ and 1.2 mM respectively, for $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$, $[\text{Mn}(\text{L}^2)]^{2-}$, $[\text{Mn}(\text{L}^3)]^-$, $[\text{Mn}(\text{HL}^4)]$, $[\text{Mn}(\text{HL}^5)]^-$, $[\text{Mn}(\text{HL}^7)]^{2+}$, $[\text{Mn}(\text{L}^9)]^{2+}$ and $[\text{Mn}(\text{L}^{11})]^+$; pH 7.0) as well as in presence of human serum albumin ($c_{\text{Mn}(\text{L})} = 1.17, 1.56$ and 1.20 mM respectively, for $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$, $[\text{Mn}(\text{L}^9)]^{2+}$ and $[\text{Mn}(\text{L}^{11})]^+$; pH 7.0) at 25 °C and 37 °C on a Stelar SMARTracer Fast Field Cycling Relaxometer (0.01-10 MHz) and a Bruker WP80 NMR electromagnet suitable for variable field measurements (20-80 MHz) and controlled by a SMARTracer PC-

Partie expérimentale

RMN console. The temperature was monitored by a VTC91 temperature control unit and maintained by a gas flow. The temperature was determined by prior calibration with a Pt resistance temperature probe. For measurements in human serum, a concentrated solution of the corresponding complex was diluted 10× in human serum albumin.

For studies of dissociation kinetics of the $\text{Mn}(\text{L}^1)$ complex, NMRD profiles were recorded in aqueous solution of the complex ($c_{\text{Mn}(\text{L}^1)} = 1.1 \text{ mM}$) in the presence or absence of 50 equ of Zn^{2+} . To acidify the samples, we used a solution of HCl (0.05 M).

8. ^{17}O NMR studies

Transverse ^{17}O relaxation times (T_2) and chemical shifts at variable temperature were measured in aqueous solutions of the Mn^{2+} complexes ($c_{\text{Mn}(\text{L})} = 3.4, 4.58, 4.19, 4.14, 4.50, 3.35, 4.50$ and 4.09 mmol/kg , respectively for $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$, $[\text{Mn}(\text{L}^2)]^{2-}$, $[\text{Mn}(\text{L}^3)]^-$, $[\text{Mn}(\text{HL}^4)]$, $[\text{Mn}(\text{HL}^5)]^-$, $[\text{Mn}(\text{HL}^7)]^{2+}$, $[\text{Mn}(\text{L}^9)]^{2+}$ and $[\text{Mn}(\text{L}^{11})]^+$; pH 7.36) using of a Bruker ARX 400 spectrometer (9.4 T). Each sample was sealed in a glass sphere inserted into a 10 mm NMR tube to remove magnetic susceptibility corrections to chemical shifts.⁹ To improve sensitivity in ^{17}O NMR, water enriched in ^{17}O (11.10% H_2^{17}O , Cortecnet) was added to the solutions to give about 1% enrichment in ^{17}O . Acidified water solution (HClO_4 , pH 3) was used as an external reference. It was previously shown that acidified water reference or the diamagnetic analog Zn^{2+} of the Mn^{2+} complex measured at the same the concentration and pH as the paramagnetic sample gave identical results.¹⁰ The temperature was varied between 273 and 348 K for $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$, $[\text{Mn}(\text{L}^3)]^-$ and $[\text{Mn}(\text{L}^9)]^{2+}$; 271 and 358 K for $[\text{Mn}(\text{HL}^5)]^-$, $[\text{Mn}(\text{HL}^7)]^{2+}$ and $[\text{Mn}(\text{L}^{11})]^+$; 278 and 363 K for $[\text{Mn}(\text{L}^2)]^{2-}$; 271 and 348 K for $[\text{Mn}(\text{HL}^4)]$. The temperature was calculated according to the previous calibration with ethylene glycol and methanol.¹¹ Transverse relaxation times (T_2) were obtained by the Carr-Purcell-Meiboom-Gill spin echo technique.¹² The technique of ^{17}O NMR measurements on paramagnetic complexes has been described in detail elsewhere.¹³ The ^{17}O NMR data were analysed according to the Solomon-Bloembergen-Morgan paramagnetic relaxation theory.¹⁴

For studies of dissociation kinetics of the $[\text{Mn}(\text{HL}^1)]$ complex, the ^{17}O transverse relaxation times at variable temperature were measured in aqueous solution of the complex ($c_{\text{Mn}(\text{HL}^1)} = 3.74 \text{ mmol / kg}$) in the presence or absence of 50 equ of Zn^{2+} at the same pH. To acidify the samples, we used a solution of deuterium chloride, 35 wt. % solution in D_2O , 99% D.

9. NMR studies

9.1. Study of the dissociation kinetics of the complex [Mn(HL¹)]

The complex was prepared by mixing 1 eq. of L¹ (2.5 mM), with 1 eq. of MnCl₂ in D₂O (99.96 % D, Eurisotop), and the pD was adjusted to 7.41 either with adding NaOD (12 M) or DCl (12 M) to the solution and the sample was heated at 60 °C for 30 min.

The sample at pD 5.41 is obtained by adding DCl (12 M) to the sample prepared at pD 7.41. ¹H, TOCSY and HSQC spectra were recorded at 700 MHz on a Bruker Avance Spectrometer using a 5mm BBFO probe, at 25 °C.

9.2. Conformational studies of the ligands L¹⁻⁶

Ligands are prepared at 3 mM, pD 7.41 in D₂O (99.96 % D, Eurisotop), and ¹H, TOCSY, ROESY and HSQC spectra were recorded at 600 MHz on a Bruker Avance Spectrometer using a 5mm BBFO probe, at 25 °C.

Figures 6.1 to 6.5 show the spectra obtained.

Partie expérimentale

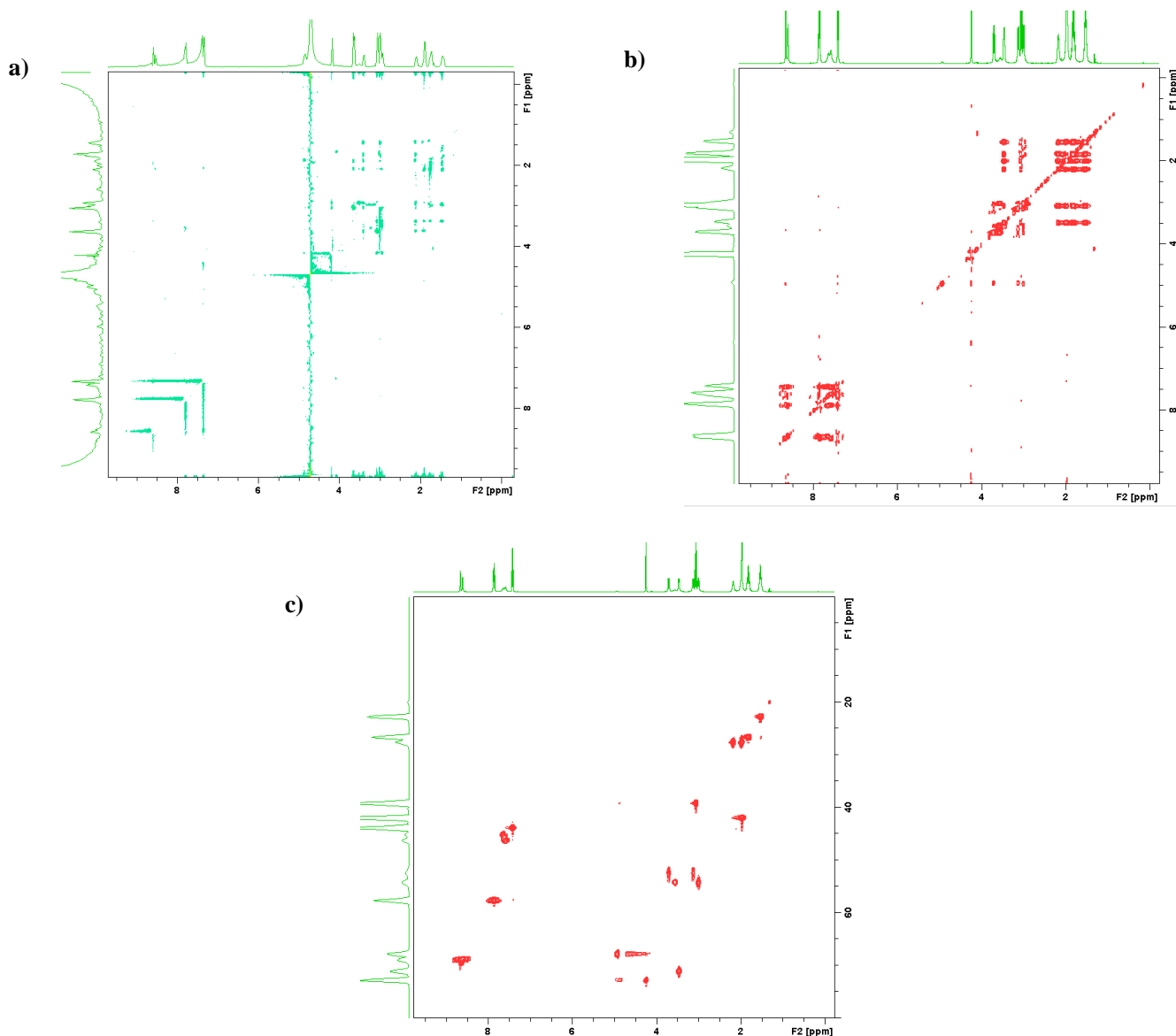


Figure 6.1 : a) ROESY ; b) TOCSY ; and c) HSQC spectra of L^1 .

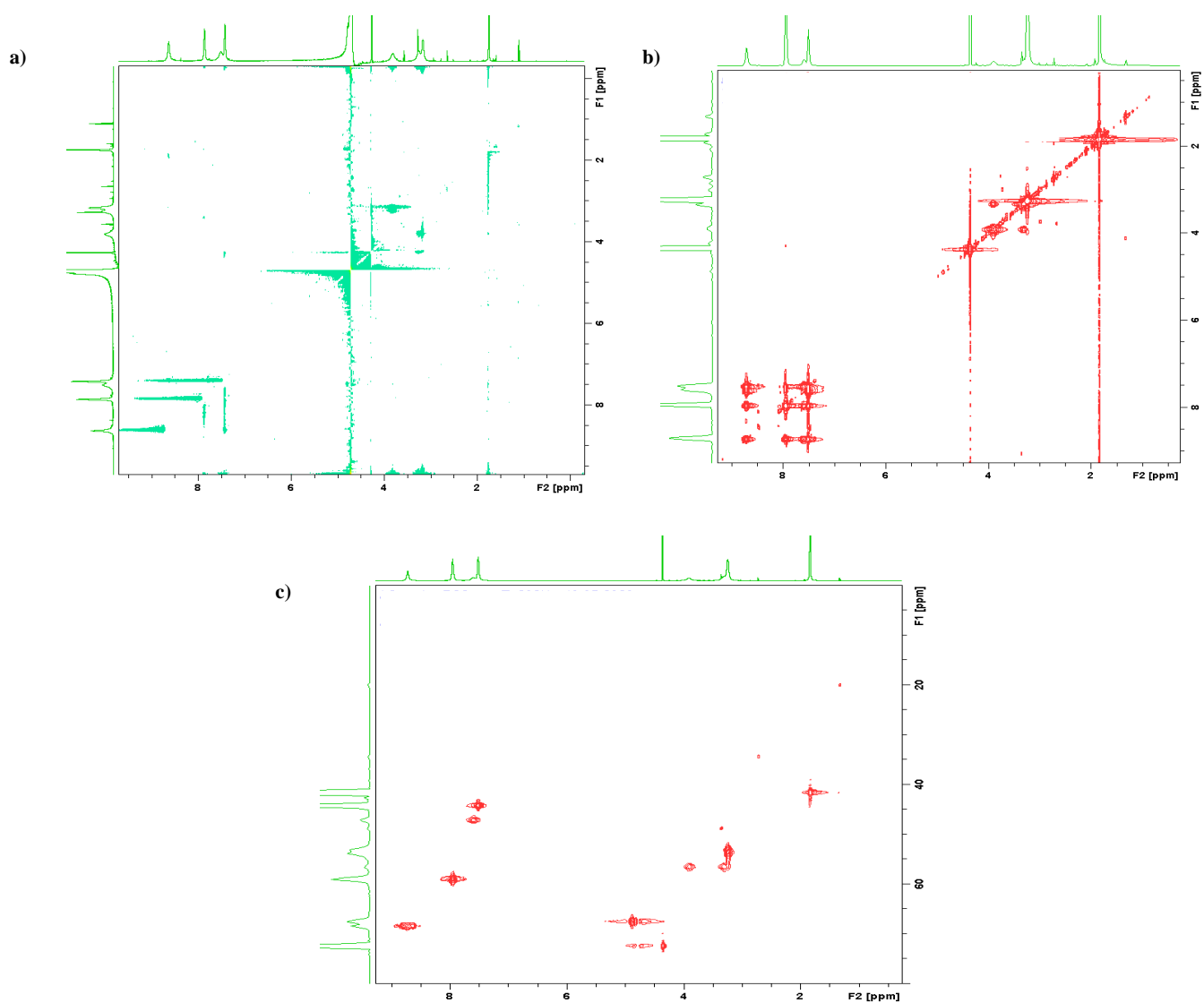


Figure 6.2 : a) ROESY ; b) TOCSY ; and c) HSQC spectra of L^2 .

Partie expérimentale

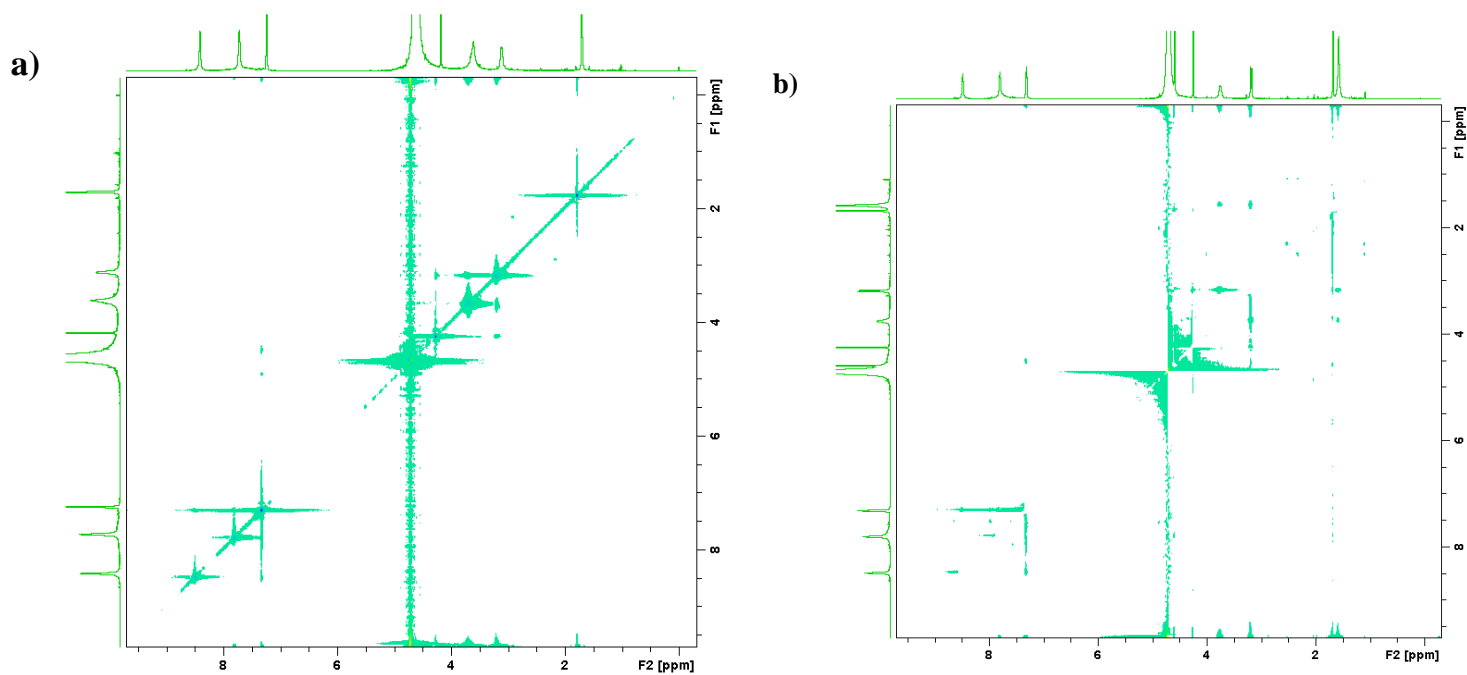


Figure 6.3 : a-b) ROESY spectra respectively of L^3 and L^6 .

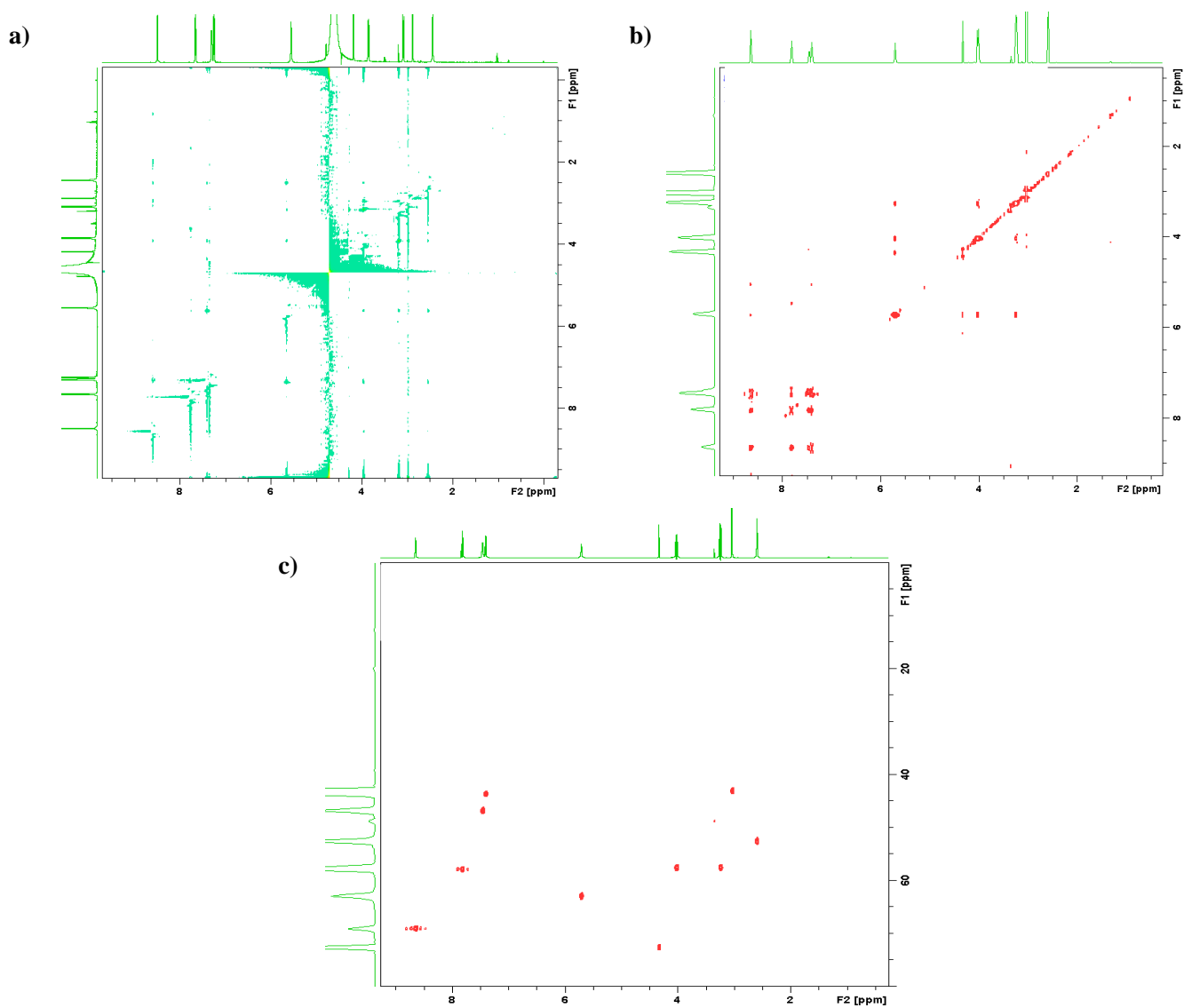


Figure 6.4 : a) ROESY ; b) TOCSY ; and c) HSQC spectra of L^4 .

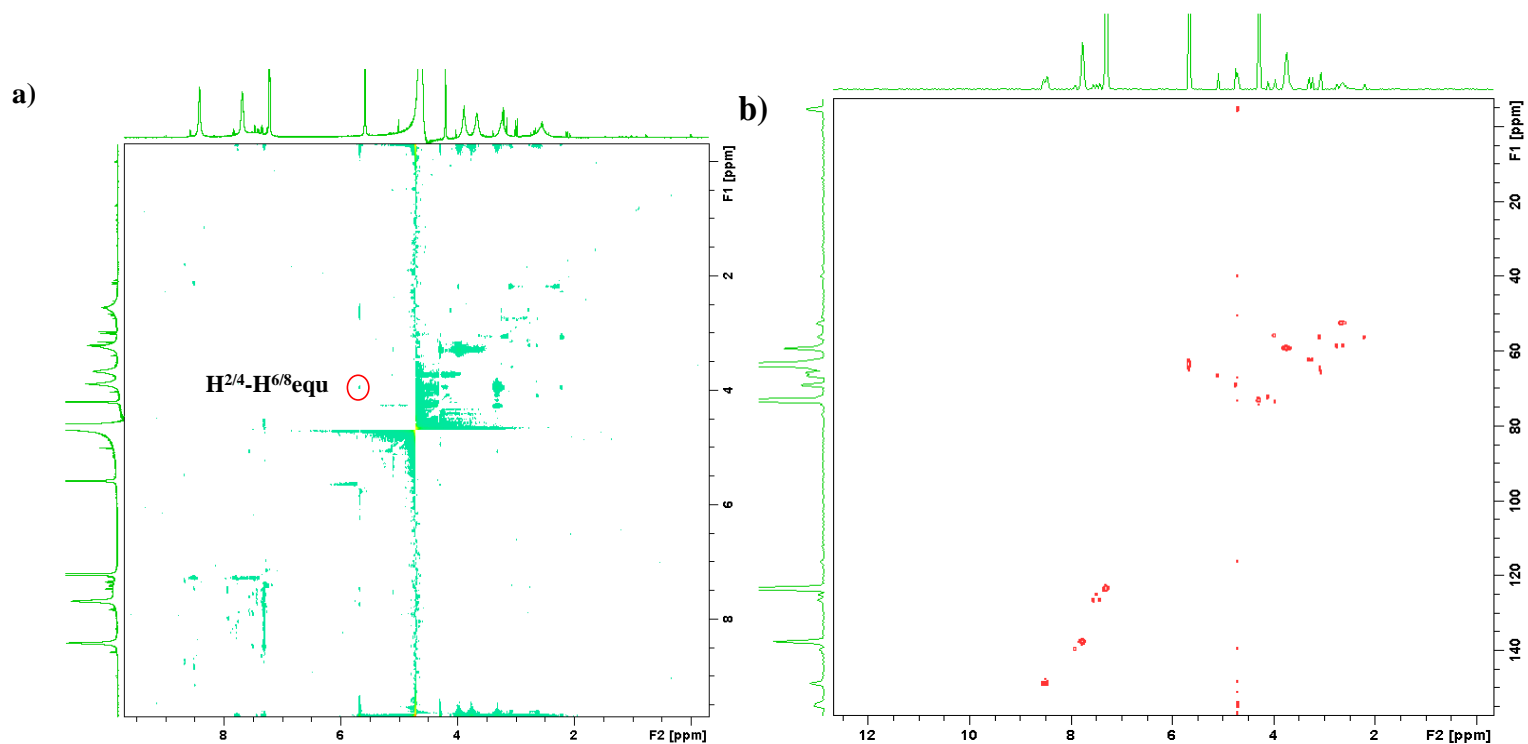


Figure 6.5 : a) ROESY and b) HSQC spectra of L^5 .

9.3. NMR titration of L^{10} in the presence of Zn^{2+}

1H NMR spectra of a $[Zn(L^{10})]^+$ solution ($c = 3.5$ mM) were recorded in D_2O between pD 1.6 and 11.62 at 600 MHz on a Bruker Avance Spectrometer using a 5mm BBFO probe, at 25 °C (figure 6.6).

Chapitre 6

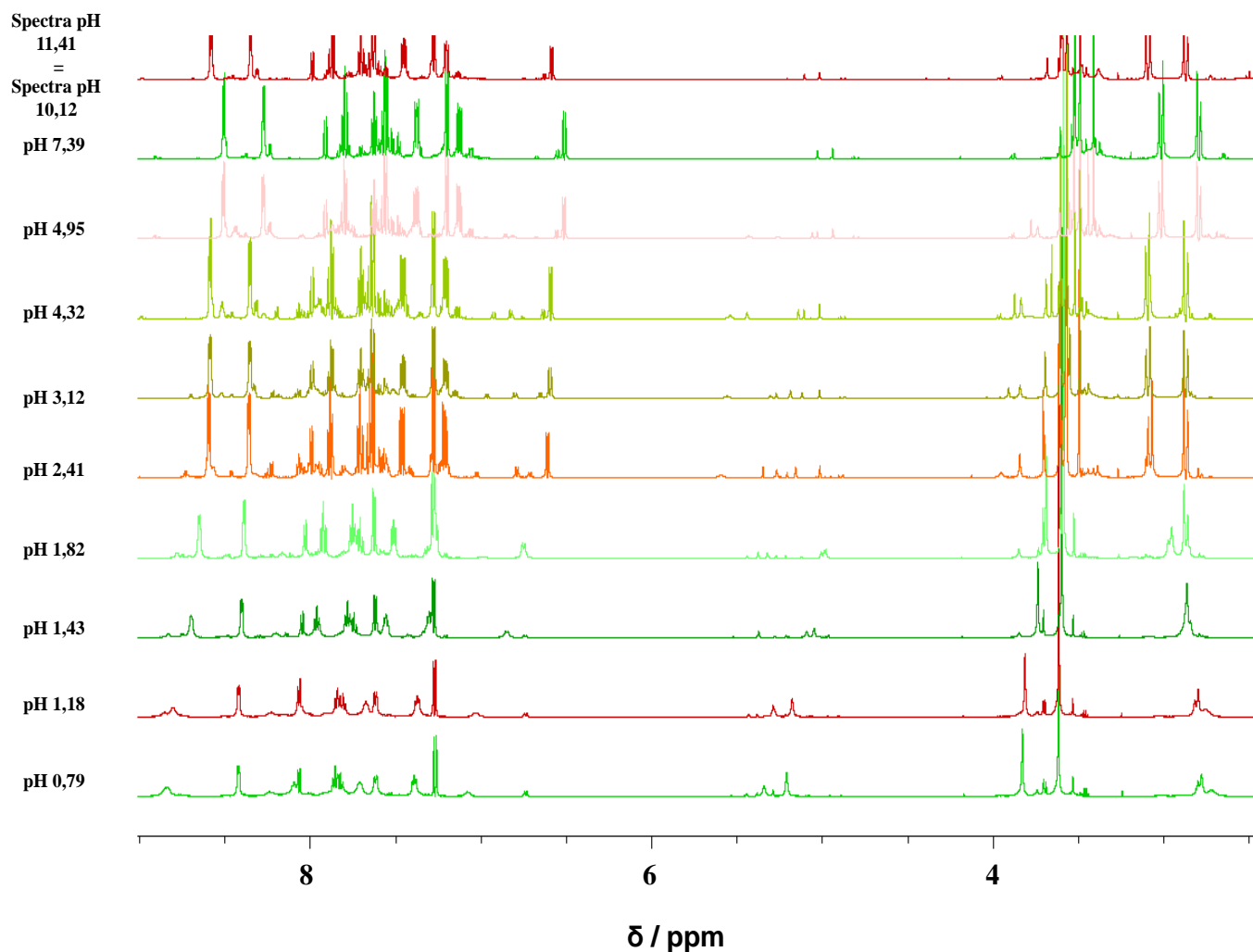


Figure 6.6 : ^1H spectrum of L^{10} in the presence of 1 equ Zn^{2+} at different pH, 600 MHz.

10. UV-visible spectroscopy

UV-Vis spectra of the ligand and Mn^{2+} , Zn^{2+} , or Cu^{2+} complex solutions ($C_{\text{lig or complex}} = 50 \mu\text{M}$, $I = 0.1 \text{ M}$) were recorded on a PerkinElmer Lambda 19 spectrometer (1 cm quartz cells) at 25°C .

11. *In vivo* MRI studies

Partie expérimentale

8-weeks-old C57BL/6JRj wild type females were purchased from Janvier Labs (Le Genes Saint Isle, France). All animal experiments were carried out in accordance with the guidelines for animal experiments and under permission number 20366, from the French “Ministère de l’Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l’Innovation”.

Magnetic resonance acquisitions were performed on a 7 T Pharmascan 70/16 superconducting magnet (Bruker, Wissembourg, France) with a shielded gradient set (230 mT m⁻¹ maximum gradient amplitude) and a transmit-receive quadrature coil with an inner diameter of 38 mm. Animals were anesthetized by inhalation of 2% isoflurane then maintained during MR experiments at 1.5% (0.5 L min⁻¹ mixed in air and oxygen with 1:1 ratio). The physiological body temperature was maintained inside the magnet by circulating warm water. A pressure sensor was used to monitor the respiration cycle and obtain the respiration frequency for the reconstruction of Ig-FLASH (intragate fast low angle shot) sequence.

For organs localization, coronal images were acquired using a gradient echo (Ig-Flash) sequence with the following parameters: TE/TR = 4 ms/200 ms, flip angle = 20°, FOV size = 3.5 x3.5 cm, matrix size = 256*256, slice thickness = 1 mm, to display 137×137 μm² in plane resolution for a duration of 4 min (10 accumulations).

The Dynamic Contrast Enhancement (DCE) experiment consisted of a T1-weighted RARE spin echo sequence (Rare factor = 4, field of view = 3*3 cm, matrix =128*128, TR/TE = 16/500 and 20/250 ms, respectively for [Mn(HL¹)] and [Mn(L¹¹)]⁺/DOATAREM, slice thickness=700 μm). Two sagittal T1-weighted images were acquired to cover different organs every 2 minutes during one hour. The contrast agent was manually injected (For [Mn(HL¹)] : 90μl ; 60μmol/kg; n = 4 and for [Mn(L¹¹)]⁺/DOTAREM : 55 μl ; 20 μmol/kg ; n = 3) 4 min after the beginning of the acquisition *via* a catheter placed in the caudal vein. Grey level means in the kidney, muscle, heart, lung, and liver were plotted as a function of time during one hour.

After the MRI scans, three mice were sacrificed, the organs of interest harvested (kidneys, liver, spleen, lungs, brain, muscle, bone, blood) and their Mn content determined by ICP-OES for Mn(L¹) and ICP-MS for Mn(L¹¹) (see detailed ICP-OES and ICP-MS protocol below). For comparison purposes, Mn-based biodistribution of non-injected control mice (n = 3) was also performed.

12. ICP-OES and ICP-MS measurements

12.1. ICP-OES

Chapitre 6

ICP-OES measurements were performed with a Jobin Yvon ULTIMA2 Spectrometer (Longjumeau, France). Standard Mn solutions were prepared from a commercial Multielement solution 1 for ICP (Sigma-Aldrich, France) in 5% HNO₃ matrix.

For *ex vivo* biodistribution studies in mice, the tissue samples were digested in conc HNO₃ for 48 h at room temperature followed by 18 h at 65 °C. The resulting solutions were then diluted 1:12, to reach 5% in HNO₃. Measurements were performed in triplicate, using the most accurate band for Mn (257.610 nm) yielding a calibration curve with R² of 0.9997. Data are presented as mean±SD (n=3).

12.2. ICP-MS

ICP-MS measurements were performed on an Element XR spectrometer from Thermofisher, (IRAMAT, CNRS). Manganese standard solutions were prepared from a multi-element solution in 2% HNO₃. Two internal standards (Indium and Rhenium) were added to all solutions (standards and samples) to compensate for the instrumental signal drift. The biological tissues were digested in 67% HNO₃ by heating for 20 h at 80 °C. The solutions were then diluted to obtain 2% HNO₃. The measurements are carried out on the mass of the ⁵⁵Mn²⁺.

13. ⁵²Mn²⁺ studies: Production, purification and radiolabelling

⁵²Mn (*t*_{1/2}= 5.6 d) was prepared *via* irradiation of chromium target by proton beam (14 MeV) at the CEMHTI cyclotron (Orléans, France). ⁵²Mn is produced from the ⁵²Cr(p,n)⁵²Mn nuclear reaction and decays by β⁺ to ⁵²Cr.

13.1. Production and purification of ⁵²Mn

Partie expérimentale

The Cr target has been designed and optimised as previously reported.¹⁵ Briefly, a Cr pellet of around 800 μm of thickness (~ 300 mg) was irradiated during 2 h at 7 μA with a 14 MeV proton beam. Upon irradiation, the irradiated chromium target was dissolved in 5 mL of HCl 32-35 %, for 4 h under reflux, followed by the addition of 200 mL of Ethanol in order to obtain a final solution of HCL 11M / Ethanol (97/3 (v/v)). ^{52}Mn was purified from the bulk chromium by a double separation of column with anion exchange resin AG[®] 1-X8, ultimately providing $^{52}\text{MnCl}_2$. An aliquot of the separated fractions was diluted and their radionuclidic purity was assessed by gamma spectrometry with a HPGe detector. For the data acquisition, the samples were placed at a distance of 5 cm from the crystal. The HPGe detector was calibrated in energy and efficiency for this liquid geometry with certified standard radioactive sources (Cerca France). For activity measurements, γ -ray spectrum analysis software package Genie 2000 (Canberra, USA) was used.

The ^{52}Mn is recovered as $^{52}\text{MnCl}_2$ solution at $\text{pH} \approx 1$, the pH is adjusted with NaOH in presence of ascorbic acid immediately before use. Labelling reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) plates provided by Merck or Baker (aluminium/plastic sheets cover with silica gel 60 F254). The TLCs were revealed under the appropriate conditions.

13.2. Radiolabelling of L^1

For the radiolabeling, the pH of the ^{52}Mn solution was adjusted to 7 with NaOH in the presence of ascorbic acid. L^1 was added at a $1:1 \times 10^4$ Mn: L^1 molar ratio and the mixture was incubated for 1 h at 70 °C. The radiochemical purity was followed by thin-layer chromatography (silica plates), using 5% (w/v) ammonium acetate in a 1:1 mixture of methanol and water as mobile phase. The TLCs are exposed by impregnation on a multisensitive phosphorscreen (Packard, Perkin Elmer, Meriden, USA) and revealed on a Cyclone Storage phosphor system Packard, Perkin Elmer, Shelton, USA). In this system, the free ^{52}Mn does not migrate ($R_f = 0 - 0.1$) while the $^{52}\text{Mn}(\text{L}^1)$ has a R_f of 0.8.

13.3. *In vitro* stability of [$^{52}\text{Mn}(\text{HL}^1)$]

The stability of the radiocomplex [$^{52}\text{Mn}(\text{HL}^1)$] (pH 7) was studied in presence of different media: water, saline (0.9% NaCl), PBS (Dabelcco, pH 7.4, without Ca and Mg) and HSA 0.6

Chapitre 6

mM. For this, 20 μL aliquots of the complex were mixed with 200 μL of the medium, the tubes were kept at room temperature and the complex stability followed by radio TLC (0.3 μL aliquots). The studies were performed in duplicates.

13.4. Lipophilicity

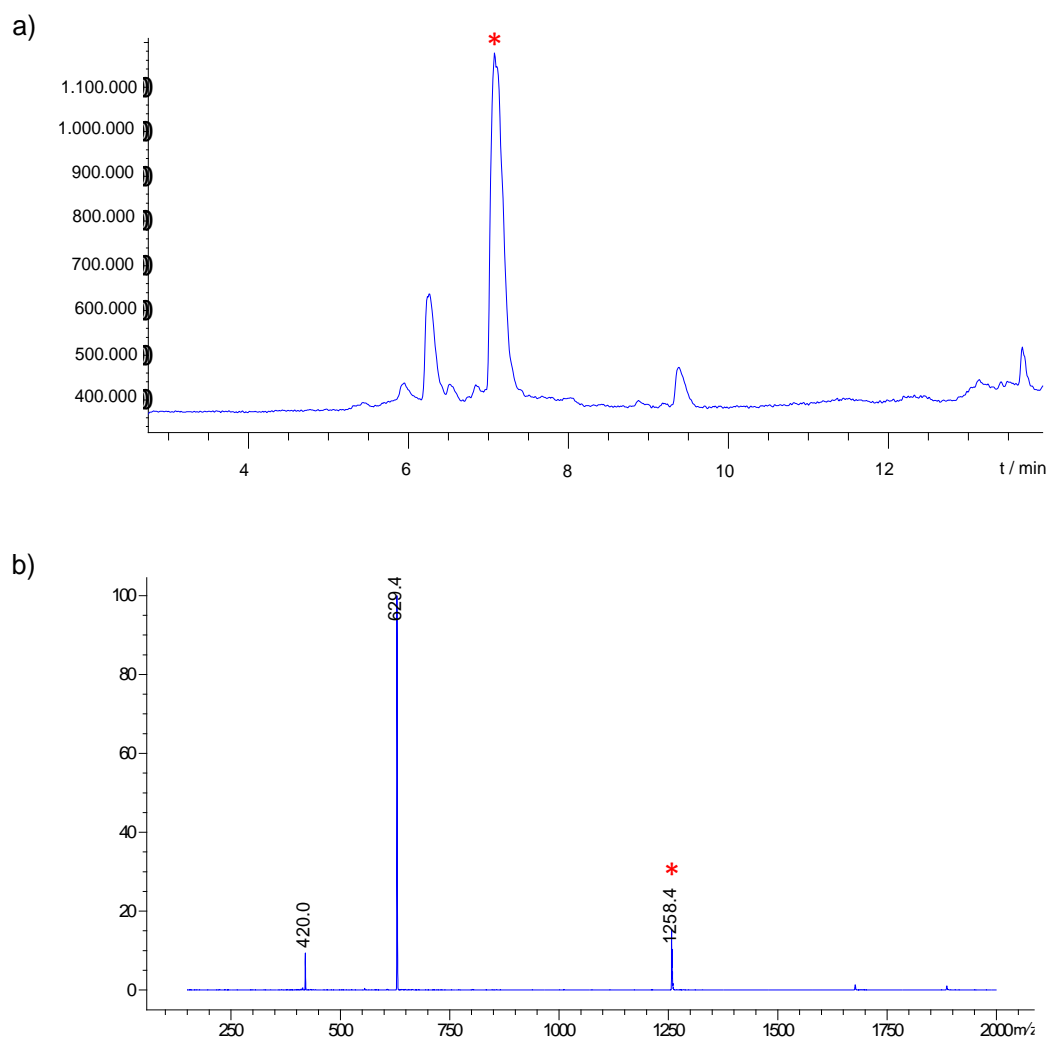
Lipophilicity was assessed through the determination of the octanol/saline partition coefficients (log P values), by the “shakeflask” method. Briefly, 100 μL of each radiocomplex was added to a solution containing 1 mL saline (pH 7.4) (obtained from a saturated octanol solution) and 1 mL of octanol, in triplicate. The resulting solutions were vortexed and centrifuged at 3000 rpm for 10 min. Aliquots of 100 μL were removed from the octanol phase and from the water phase and the activity measured in a gamma counter. The lipophilicity was calculated as the average log ratio value of the radioactivity in the organic fraction and the aqueous fraction from the three samples.

14. Biodistribution studies with [$^{52}\text{Mn}(\text{L}^1\text{-RGD})$]

For the synthesis of $\text{L}^1\text{-RGD}$, has been “activated” with a maleimide group (synthesised at IPHC, Strasbourg), to which a cyclic cysteine-RGD c(RGDfC) (Cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys) acetate salt (purchased from Bachem, Switzerland) has been conjugated. The conjugation reaction was performed at CBM, in collaboration with Jean-Baptiste Madinier and Dr. Vincent Aucagne.

The reaction was done in PBS (pH 7), 5 min at room temperature, using a molar ratio of 1.1:1 and further purified by HPLC and characterised by LC-MS (figure 6.7).

Partie expérimentale



*Figure 6.7: a-b) Liquid Chromatogram (LC) and Mass Spectrum (MS) after reaction. * : product.*

The ligand L¹-RGD was labelled with ⁵²Mn, at pH 7, 3 h at 70 °C, with an >98% yield. About 2 MBq (1.93 ± 0.04 MBq) of this solution (in 200 µL) were injected in 3 mice and a biodistribution study was performed at 4 h post-injection. The biodistribution studies were

Chapitre 6

performed in 7-week-old female SWISS nude mice bearing orthotopic tumours induced by HCT116 *Luc* cells (human colorectal cancer cells), implemented at the wall of the *caecum*.

The tumor and other organs of interest (blood, intestine, liver, spleen, kidneys, lungs, heart, brain, muscle and bone (sternum)) were harvested, weighted and their activity measured using a carpintec gamma counter as well as a GABI γ -camera.

Calibration of both equipment was done by measuring a set of 9 solutions with activities between 0 and 2 MBq in both equipment, under the same conditions of the organs' measurements (distance and time and energy range of measurement acquisition), yielding a good correlation: $y = 3E-05 x + 0.012$, $R^2 = 0.9977$.

All data were corrected for the decay, bringing the activity to the injection time of each animal, as well as converted to MBq (carpintec) using the calibration curve obtained.

References

Partie expérimentale

1. Roux, A.; Gillet, R.; Huclier-Markai, S.; Ehret-Sabatier, L.; Charbonnière, L. J.; Nonat, A. M., Bifunctional bispidine derivatives for copper-64 labelling and positron emission tomography. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2017**, *15* (6), 1475-1483.
2. Comba, P.; Jermilova, U.; Orvig, C.; Patrick, B. O.; Ramogida, C. F.; Rück, K.; Schneider, C.; Starke, M., Octadentate Picolinic Acid-Based Bispidine Ligand for Radiometal Ions. *Chemistry – A European Journal* **2017**, *23* (63), 15945-15956.
3. Kolanowski, J. L.; Jeanneau, E.; Steinhoff, R.; Hasserodt, J., Bispidine Platform Grants Full Control over Magnetic State of Ferrous Chelates in Water. *Chemistry – A European Journal* **2013**, *19* (27), 8839-8849.
4. Comba, P.; Starke, M.; Wadepohl, H., Optimization of Hexadentate Bispidine Ligands as Chelators for $^{64}\text{CuII}$ PET Imaging. *ChemPlusChem* **2018**, *83* (7), 597-604.
5. Cielski, P. Metallionenselektive Bispidin-Liganden zur potentiellen Anwendung in Therapie und Diagnostik. Thesis Chemistry Heidelberg, 2021.
6. A. E. Martell, R. J. M., *Determination and use of stability constants*. VCH Publishers: 1992.
7. P. Gans, A. S., A. Vacca, *Talanta* **1996**, *43*, 1739-1753.
8. D. S. Raiford, C. L. F., E. D. Becker, *Analytical Chemistry* **1979**, *51*, 2050-2051.
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 T. *Helvetica Chimica Acta* **1985**, *68*, 508-521.
10. Drahos, B.; Kotek, J.; Hermann, P.; Lukes, I.; Toth, E., Mn^{2+} Complexes with Pyridine-Containing 15-Membered Macrocycles: Thermodynamic, Kinetic, Crystallographic, and H-1/O-17 Relaxation Studies. *Inorganic Chemistry* **2010**, *49* (7), 3224-3238.
11. 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.
12. Meiboom, S.; Gill, D., Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times. *Rev. Sci. Instrum.* **1958**, *29*, 688-691.
13. Micskei, K.; Helm, L.; Brucher, E.; Merbach, A. E., O-17 NMR Study of Water Exchange on $[\text{Gd}(\text{DTPA})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ and $[\text{Gd}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$ Related to NMR Imaging. *Inorganic Chemistry* **1993**, *32* (18), 3844-3850.
14. Merbach, A.; Helm, L.; Toth, E., *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic resonance Imaging*. Second Edition ed.; John Wiley & Sons: Chichester, 2013.
15. Vaudon, J.; Frealle, L.; Audiger, G.; Dutilly, E.; Gervais, M.; Sursin, E.; Ruggeri, C.; Duval, F.; Bouchetou, M.-L.; Bombard, A.; Silva, I. D., First Steps at the Cyclotron of Orléans in the Radiochemistry of Radiometals: ^{52}Mn and ^{165}Er . *Instruments* **2018**, *2* (3).

Annexe

Annexe

Annexe 1 : Analysis of ¹⁷O NMR and NMRD data

The ¹⁷O NMR data have been fitted according to the Swift and Connick equations.¹ The reduced transverse ¹⁷O relaxation rates, $1/T_{2r}$, and reduced ¹⁷O chemical shifts, ω_r , are 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 (A1.1) and (A1.2) :

$$\frac{1}{T_{2r}} = \frac{1}{P_m} \left[\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_{2A}} \right] = \frac{1}{\tau_m} \frac{T_{2m}^{-2} + \tau_m^{-1} T_{2m}^{-1} + \Delta\omega_m^2}{(\tau_m^{-1} + T_{2m}^{-1})^2 + \Delta\omega_m^2} \quad \text{equation A1.1}$$

$$\Delta\omega_r = \frac{1}{P_m} (\omega - \omega_A) = \frac{\Delta\omega_m}{(1 + \tau_m T_{2m}^{-1})^2 + \tau_m^2 \Delta\omega_m^2} \quad \text{equation A1.2}$$

$\Delta\omega_m$ is determined by the hyperfine or scalar coupling constant, A_O/\hbar , where B represents the magnetic field, S is the electron spin and g_L is the isotropic Landé g factor (Equation (A1.3)).

$$\Delta\omega_m = \frac{g_L \mu_B S(S+1) B A_O}{3k_B T \hbar} \quad \text{equation A1.3}$$

The chemical shifts are measured with high errors (given the large linewidths) and the reduced chemical shifts were not further used in the fit.

The ¹⁷O transverse relaxation rate is mainly determined by the scalar contribution, $1/T_{2sc}$, and it is given by Equation (A1.4).

$$\frac{1}{T_{2m}} \cong \frac{1}{T_{2sc}} = \frac{S(S+1)}{3} \left(\frac{A_O}{\hbar} \right)^2 \left(\tau_{s1} + \frac{\tau_{s2}}{1 + \tau_{s2}^2 \omega_s^2} \right) \quad \frac{1}{\tau_{si}} = \frac{1}{\tau_m} + \frac{1}{T_{ie}} \quad \text{equation A1.4}$$

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 (A1.5)) 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.

Annexe

$$\frac{1}{\tau_m} = k_{\text{ex}} = \frac{k_B T}{h} \exp\left\{\frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT}\right\} = \frac{k_{\text{ex}}^{298} T}{298.15} \exp\left\{\frac{\Delta H^\ddagger}{R} \left(\frac{1}{298.15} - \frac{1}{T}\right)\right\} \quad \text{equation A1.5}$$

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 $1/T_{2e}$, McLachlan has developed Equations (A1.6)–(A1.8)² :

$$\left(\frac{1}{T_{1e}}\right) = \frac{32}{25} \Delta^2 \left(\frac{\tau_v}{1 + \omega_S^2 \tau_v^2} + \frac{4\tau_v}{1 + 4\omega_S^2 \tau_v^2} \right) \quad \text{equation A1.6}$$

$$\left(\frac{1}{T_{2e}}\right) = \frac{32}{50} \Delta^2 \left[3\tau_v + \frac{5\tau_v}{1 + \omega_S^2 \tau_v^2} + \frac{2\tau_v}{1 + 4\omega_S^2 \tau_v^2} \right] \quad \text{equation A1.7}$$

$$\tau_v = \tau_v^{298} \exp\left\{\frac{E_v}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{298.15}\right)\right\} \quad \text{equation A1.8}$$

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.

The proton relaxivities (normalized to 1 mM Mn^{2+} concentration) originate from inner-, second- and outer-sphere contributions (Equation (A1.9)) :

$$r_1 = r_{1is} + r_{1,2nd} + r_{1os} \quad \text{equation A1.9}$$

The inner-sphere term is given by Equation (A1.10), where q is the number of inner-sphere water molecules.

$$r_{1is} = \frac{1}{1000} \times \frac{q}{55.55} \times \frac{1}{T_{1m}^H + \tau_m} \quad \text{equation A1.10}$$

In the longitudinal relaxation rate of inner sphere water protons, $1/T_{1m}^H$, the dipolar contribution dominates (Equation (A1.11)) :

$$\frac{1}{T_{1m}^H} \cong \frac{1}{T_1^{DD}} = \frac{2}{15} \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\hbar^2 \gamma_S^2 \gamma_I^2}{r_{MnH}^6} S(S+1) \left[\frac{3\tau_{d1H}}{1 + \omega_1^2 \tau_{d1H}^2} + \frac{7\tau_{d2H}}{1 + \omega_S^2 \tau_{d2H}^2} \right] \quad \text{equation A1.11}$$

Annexe

Here r_{MnH} is the effective distance between the Mn^{2+} electron spin and the water protons, ω_l is the proton resonance frequency, τ_{diH} is given by Equation A1.12, where τ_{RH} is the rotational correlation time of the Mn^{2+} - H_{water} vector (Equation (A1.12)) :

$$\frac{1}{\tau_{\text{diH}}} = \frac{1}{\tau_{\text{m}}} + \frac{1}{\tau_{\text{RH}}} + \frac{1}{T_{\text{ie}}} \quad i = 1, 2; \quad \text{equation A1.12}$$

The second sphere relaxivity term, $r_{1,2\text{nd}}$, can be described with the same formalism as the inner sphere term (equations A1.9-A1.12), but using the appropriate second sphere parameters: the hydration number in the second sphere, $q_{2\text{nd}}$, the water exchange rate, $k_{\text{ex}2\text{nd}}$, and its activation enthalpy $\Delta H_{2\text{nd}}$, and the distance between Mn^{2+} and the 2nd sphere water protons, $r_{\text{MnH}2\text{nd}}$, in the equations A1.10-A1.12.

The outer-sphere contribution to the overall relaxivity is described by Equation (A1.13), where N_{A} is the Avogadro constant, and J_{os} is a spectral density function (Equation (A1.14)).

$$r_{\text{ios}} = \frac{32N_{\text{A}}\pi}{405} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\hbar^2 \gamma_{\text{S}}^2 \gamma_{\text{I}}^2}{a_{\text{MnH}} D_{\text{MnH}}} S(S+1) [3J_{\text{os}}(\omega_1, T_{1e}) + 7J_{\text{os}}(\omega_{\text{S}}, T_{2e})] \quad \text{equation A1.13}$$

$$J_{\text{os}}(\omega, T_{je}) = \text{Re} \left[\frac{1 + \frac{1}{4} \left(i\omega\tau_{\text{MnH}} + \frac{\tau_{\text{MnH}}}{T_{je}} \right)^{1/2}}{1 + \left(i\omega\tau_{\text{MnH}} + \frac{\tau_{\text{MnH}}}{T_{je}} \right)^{1/2} + \frac{4}{9} \left(i\omega\tau_{\text{MnH}} + \frac{\tau_{\text{MnH}}}{T_{je}} \right) + \frac{1}{9} \left(i\omega\tau_{\text{MnH}} + \frac{\tau_{\text{MnH}}}{T_{je}} \right)^{3/2}} \right] \quad \text{equation A1.14}$$

$$j = 1, 2$$

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 (A1.15), with activation energy E_{MnH} :

$$D_{\text{MnH}} = D_{\text{MnH}}^{298} \exp \left\{ \frac{E_{\text{MnH}}}{R} \left(\frac{1}{298.15} - \frac{1}{T} \right) \right\} \quad \text{equation A1.15}$$

In the simultaneous fit of the ^{17}O relaxation rates and the proton relaxivities, the distance between the metal ion and the inner and outer sphere water protons were set to $r_{\text{MnH}} = 2.83 \text{ \AA}$

Annexe

and $a_{\text{MnH}} = 3.6 \text{ \AA}$, respectively³; the diffusion coefficient and its activation energy were assigned to $D_{\text{MnH}} = 26 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ and $E_{\text{MnH}} = 20 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$; E_v was set to $1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Annexe 2 : ^{17}O transverse relaxivities of Mn^{2+} complexes as a function of the temperature

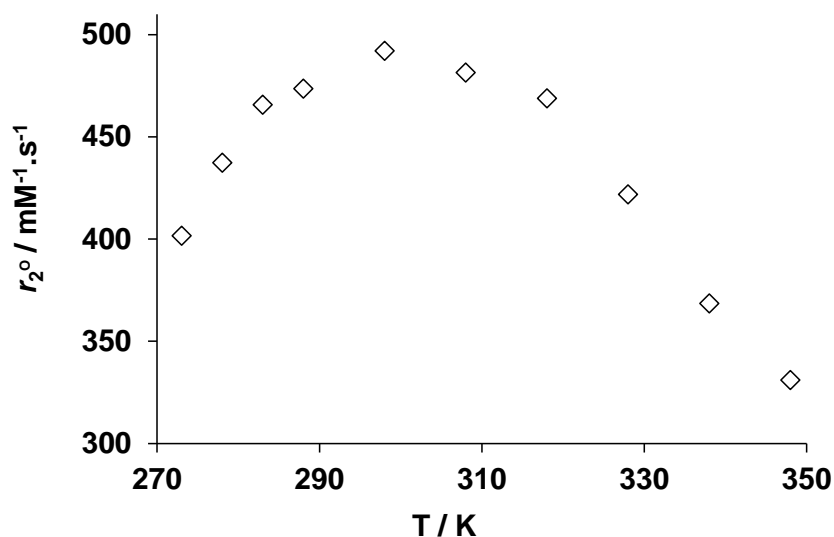


Figure A2.1 ^{17}O transverse relaxivities of $\text{Mn}(\text{L}^3)$ as a function of the temperature. The maximum is used to estimate the hydration number: $q = 492/510 = 0.96$.⁴ 400 MHz.

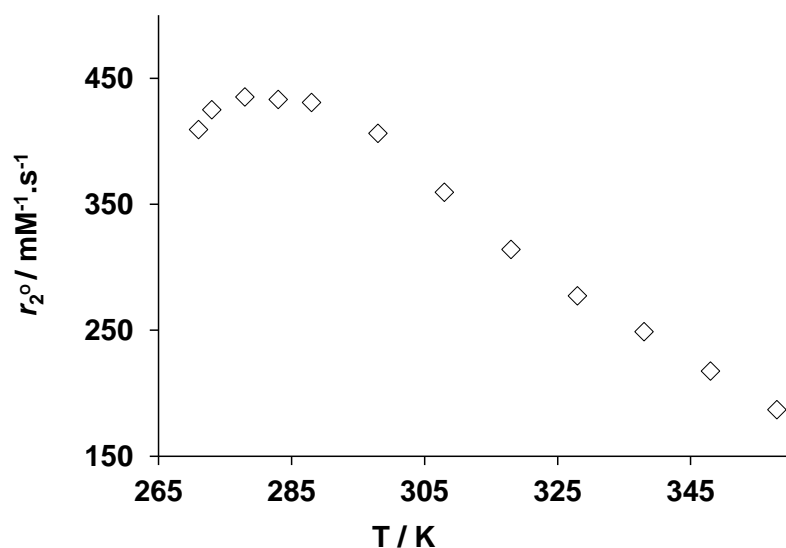


Figure A2.2 ^{17}O transverse relaxivities of $\text{Mn}(\text{L}^7)$ as a function of the temperature. The maximum is used to estimate the hydration number: $q = 435/510 = 0.85$.⁴ 400 MHz.

Annexe 3 : *In vivo* MRI studies

Table A3 : Mn tissue content of endogenous (baseline), following 1h30 injection of 0.06 mmol/kg of Mn(L¹) and 24h injection of 0.02 mmol/kg of Mn(L¹¹) in wild type mice determined respectively by ICP-OES and ICP-MS. Data are presented as nmol/g \pm SD (n = 3).

	baseline	Mn(L ¹)	Mn(L ¹¹)
Brain	10.52 \pm 1.09	9.42 \pm 0.61	-
Liver	19.91 \pm 6.27	26 \pm 7	20.4 \pm 4.0
Muscle	27.03 \pm 10.30	27 \pm 4	-
Bone	34.13 \pm 1.81	40 \pm 26	-
Lungs	13.25 \pm 1.14	26 \pm 13	3.3 \pm 0.3
Spleen	19.96 \pm 0.62	8.4 \pm 4.2	2.2 \pm 0.9
Kidneys	34.98 \pm 0.57	161 \pm 106	19.6 \pm 3.4
Blood	3.63 \pm 0.04	19 \pm 8	< 0.05

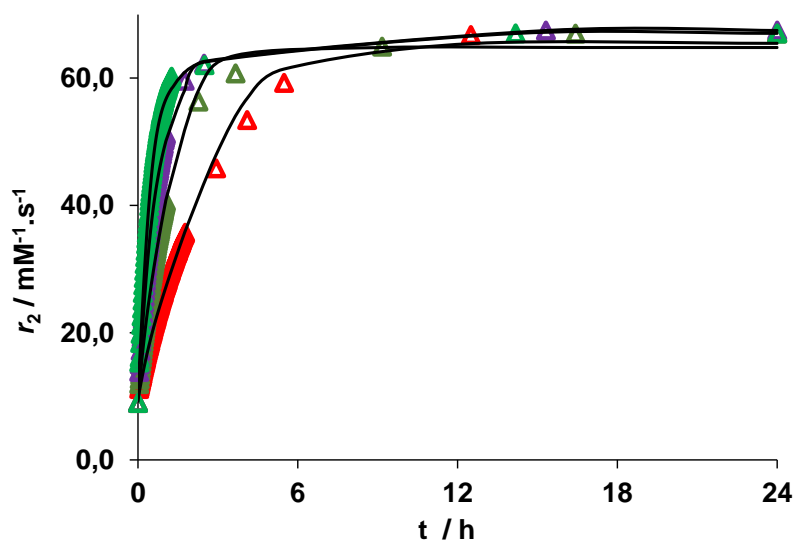
Annexe 4 : Dissociation kinetic studies

Figure A4.1 : Variation of r_2 as a function of time during transmetalation by Cu²⁺ with Mn(L⁹). 60 MHz, 25 °C, pH 2.30 ; $c_{MnL} = 1,6$ mM. Δ : $c_{Cu^{2+}} = 16$ mM ; \triangle : $c_{Cu^{2+}} = 32$ mM ; \blacktriangle : $c_{Cu^{2+}} = 48$ mM ; \blacktriangledown : $c_{Cu^{2+}} = 64$ mM. The curves represent the fits of the experimental data.

Annexe

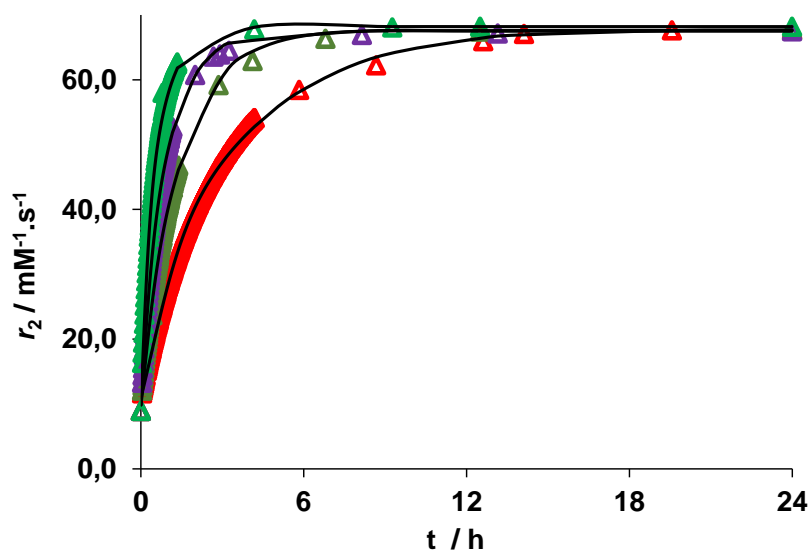


Figure A4.2 : Variation of r_2 as a function of time during transmetalation by Cu^{2+} with $\text{Mn}(\text{L}^9)$. 60 MHz, 25 °C, pH 2.50 ; $c_{\text{MnL}} = 1,6 \text{ mM}$. Δ : $c_{\text{Cu}^{2+}} = 16 \text{ mM}$; \triangle : $c_{\text{Cu}^{2+}} = 32 \text{ mM}$; \triangleleft : $c_{\text{Cu}^{2+}} = 48 \text{ mM}$; \blacktriangle : $c_{\text{Cu}^{2+}} = 64 \text{ mM}$. The curves represent the fits of the experimental data.

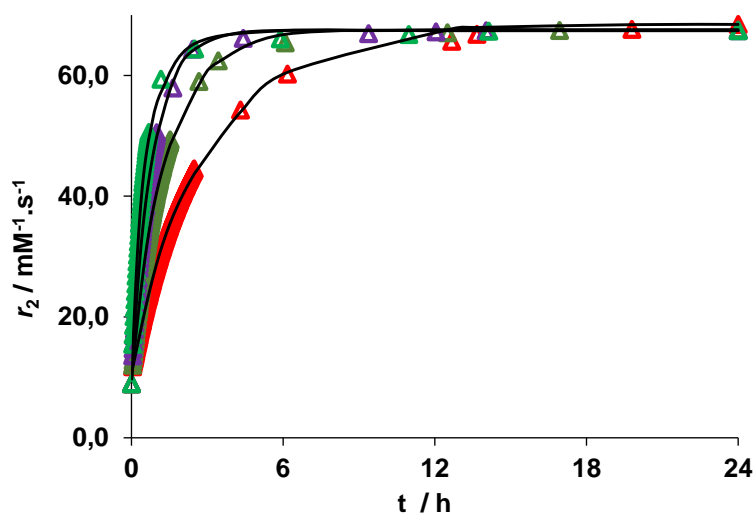


Figure A4.3 : Variation of r_2 as a function of time during transmetalation by Cu^{2+} with $\text{Mn}(\text{L}^9)$. 60 MHz, 25 °C, pH 2.70 ; $c_{\text{MnL}} = 1,6 \text{ mM}$. Δ : $c_{\text{Cu}^{2+}} = 16 \text{ mM}$; \triangle : $c_{\text{Cu}^{2+}} = 32 \text{ mM}$; \triangleleft : $c_{\text{Cu}^{2+}} = 48 \text{ mM}$; \blacktriangle : $c_{\text{Cu}^{2+}} = 64 \text{ mM}$. The curves represent the fits of the experimental data.

Annexe

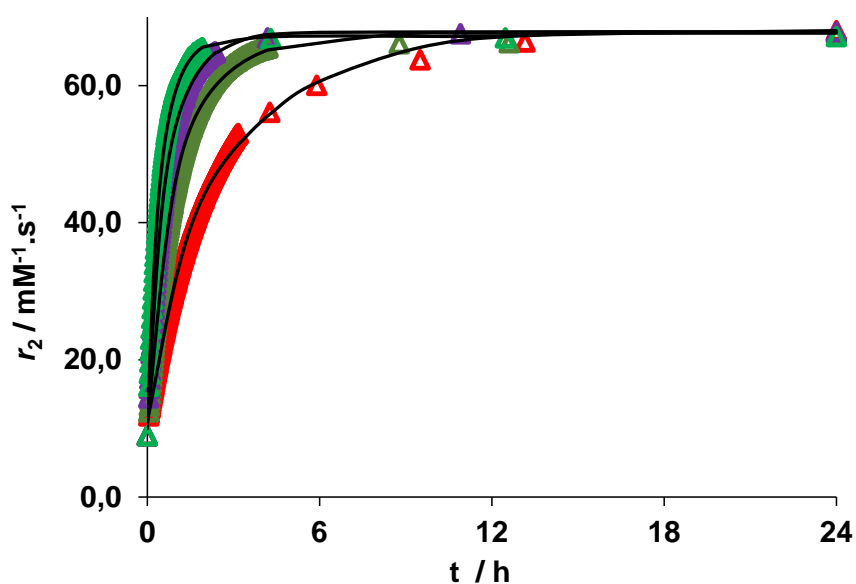


Figure A4.4 : Variation of r_2 as a function of time during transmission by Cu^{2+} with $\text{Mn}(\text{L}^9)$. 60 MHz, 25 °C, pH 3.53 ; $c_{\text{MnL}} = 1,6 \text{ mM}$. Δ : $c_{\text{Cu}^{2+}} = 16 \text{ mM}$; \triangle : $c_{\text{Cu}^{2+}} = 32 \text{ mM}$; \triangle : $c_{\text{Cu}^{2+}} = 48 \text{ mM}$; \triangle : $c_{\text{Cu}^{2+}} = 64 \text{ mM}$. The curves represent the fits of the experimental data.

Annexe 5 : ^1H NMR spectrum of $\text{Zn}(\text{L}^{10})$, $\text{Zn}_2(\text{L}^{10})$: pH 6.5 and pH 8.5

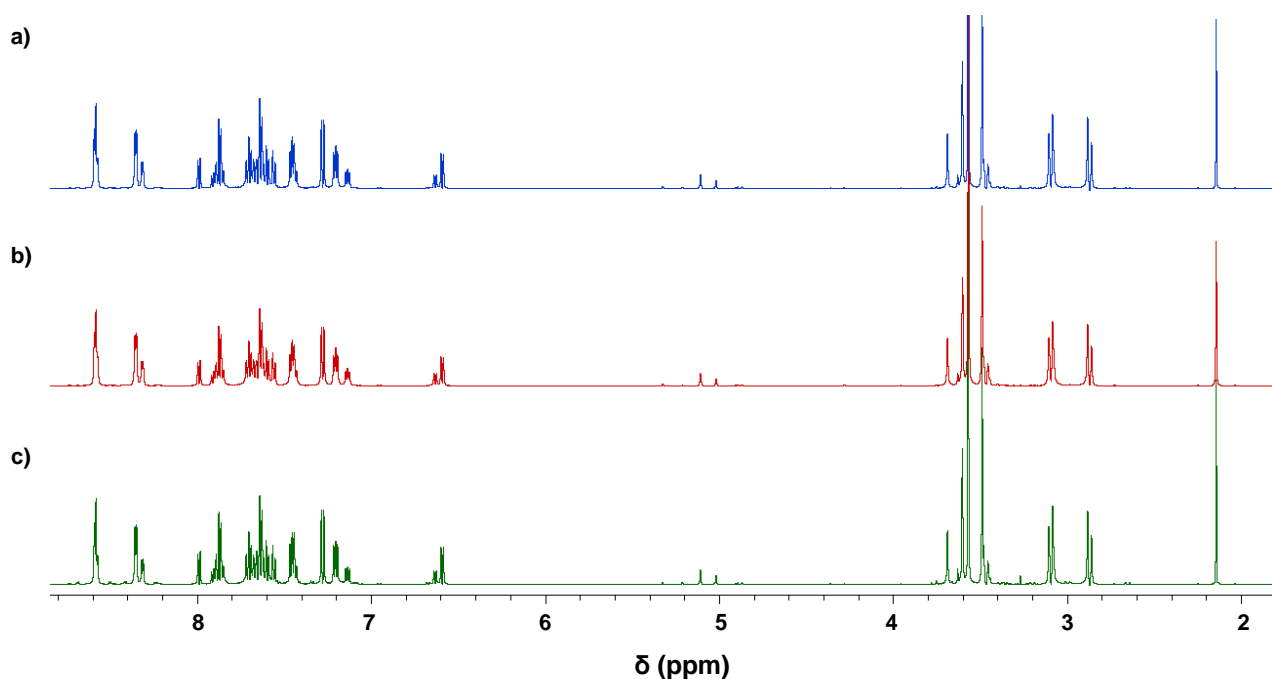


Figure A5 : ^1H NMR spectrum of : a) $\text{Zn}_2(\text{L}^{10})$: pH 8.5 ; b) $\text{Zn}_2(\text{L}^{10})$: pH 6.5 and c) $\text{Zn}(\text{L}^{10})$: pH 6.5 ; in D_2O , 25 °C, 600 MHz.

References

1. Swift, T. J.; Connick, R. E., NMR-Relaxation Mechanisms of O-17 in Aqueous Solutions of Paramagnetic Cations and the Lifetime of Water Molecules in the First Coordination Sphere. *J.Chem.Phys.* **1962**, 37, 2, 307-320.
2. McLachlan, A. D., Line Widths of Electron Resonance Spectra in Solution. *Proceedings of the Royal Society of London* **1964**, 280, 271-288.
3. Rolla, G. A.; Platas-Iglesias, C.; Botta, M.; Tei, L.; Helm, L., H-1 and O-17 NMR Relaxometric and Computational Study on Macrocyclic Mn(II) Complexes. *Inorganic Chemistry* **2013**, 52 (6), 3268-3279.
4. Gale, E. M.; Zhu, J.; Caravan, P., Direct Measurement of the Mn(II) Hydration State in Metal Complexes and Metalloproteins through O-17 NMR Line Widths. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135 (49), 18600-18608.

CURRICULUM VITAE

Nom : NDIAYE

Prénom : Daouda

Date et lieu de naissance : 02/01/1992 à Dakar (Sénégal)

Adresse : 67 Rue Saint Marceau, 45100 Orléans

E-mail : daoudabra600@gmail.com

TEL : 0627222509

CURSUS

- 2018/2021** : Thèse de doctorat, Centre de Biophysique Moléculaire (CBM), CNRS, Orléans
- 2017/2018** : Master 2 Chimie des molécules bioactives (CMB), Université Paris-Est Créteil Val de Marne (UPEC), Paris 12.
Mention : Bien (major de la promotion)
- 2016/2017** : Master 1 Chimie, Université Paris-Est Marne La Vallée (UPEM)
Mention : Assez bien
- 2015/2016** : Licence 3 Chimie et Applications, Université Paris-Est Marne La Vallée
- 2014/2015** : Année non diplômée à cause du décalage de calendrier scolaire entre le Sénégal et la France, ainsi que le délai des démarches administratives
- 2013/2014** : Licence 2 Physique Chimie, Université Cheikh Anta Diop de Dakar (UCAD) Mention : Bien
- 2012/2013** : Licence 1 Physique Chimie, UCAD
- 2012** : Baccalauréat sciences expérimentales (S2)

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

2014 : Stage au sein de l'équipe de recherche sur les substances bioactives à la Faculté des Sciences et techniques, UCAD pendant 3 mois, sous la direction du Pr. Ibrahima Ndiaye.

Sujet : Isolement et purification des almazoles C et D.

Mars - Mai 2018 : Stage à l'Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est (ICMPE), CNRS, sous la direction du Dr. Jacques Penelle.

Sujet : Synthèse de polyélectrolytes hydrosolubles par alkylation de l'acide polyméthacrylique.

Février - juillet 2018 : Stage master 2 au laboratoire de pharmacognosie de la Faculté de pharmacie de Paris Descartes en collaboration avec le laboratoire de chimie des produits naturels fongiques et bactériens du Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN) sous la direction du Dr. D. Buisson et du Pr. M.C. Lallemand

Sujet : Transformations chimio-, régio, et stéréosélectives des chaînes prényles de la guttiférone A (antiparasitaire) en utilisant comme catalyseurs les enzymes de micro-organismes endophytes de millepertuis et l'hémisynthèse de dérivés des métabolites issus de ces biotransformations dans un but de pharmaco-modulation.

Octobre 2018 - 2021 : Thèse de doctorat au Centre de Biophysique Moléculaire (CBM), CNRS, Orléans.

Sujet : Complexes de manganèse (Mn^{2+}) par des ligands de type bispidine pour des applications en imagerie médicale (IRM, TEP).

COMPETENCES

- Conception d'agents de contraste pour l'imagerie médicale.
- Caractérisation de molécules organiques et inorganiques par des méthodes d'analyse telles que RMN, SM, IR, UV, potentiométrie, relaxométrie, etc.
- Méthodologie de synthèse, optimisation de réactions, suivi de réactions par REACT-IR.
- Extraction, isolement et purification de molécules d'intérêt par chromatographie en phase gazeuse, HPLC préparative, flash, centrifugation.
- Culture et isolement de micro-organismes ; biotransformations de molécules organiques.

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

- Pub¹ : Ndiaye, D.; Sy, M ; Pallier, A ; Mème, S ; Da Silva, I ; Lacerda, S ; Nonat, A.M.; Charbonnière, L.J.; Toth, E; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, 59, 11958-11963.
- Pub² : S. Lacerda, D. Ndiaye, É. Tóth, "Manganese Complexes as Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging" in "Metal Ions in Life Sciences" Eds: A. Sigel, E. Freisinger, R. K. O. Sigel © Walter de Gruyter GmbH, Berlin, Germany 2021, 22, *in press*.

- **Pub³** : S. Lacerda, D. Ndiaye, É. Tóth, “Transition metal-based MRI relaxation agents (Mn and Fe)” Eds: Rudi van Eldik Colin Hubbard © Advances in Inorganic Chemistry. **2021**, 78, *in press*.
- **Pub⁴** : Cieslik, P ; Comba, P ; Dittmar, B ; Ndiaye, D; Toth, E ; Velmurugan, G ; Wadepohl, H ; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**.

COMMUNICATIONS

Orales

- Flash presentation dans FrenchBIC 2020 virtual meeting.
- Séminaire interne : Journée des doctorants du CBM, Orléans, 2020.

Posters

- Journées GDR, Agents d'imagerie moléculaire, Dijon, 2019.
- Journée scientifique : Fédération de recherche physique et chimie du vivant, CBM-ICOA, Orléans, 2019.

INFORMATIQUE & LANGUES

- ✓ MS office, MestRenova, ChemDraw, Matlab, Hyss, Hyperquad , top spin.
- ✓ Français : lu, écrit, parlé.
- ✓ Anglais : lu, écrit, parlé.
- ✓ Woolof (sénégalais) : lu, écrit, parlé.

LOISIRS

Lecture, football, basket-ball, musique.



MRI Contrast Agents | Hot Paper

How to cite: *Angew. Chem. Int. Ed.* 2020, 59, 11958–11963
International Edition: doi.org/10.1002/anie.202003685
German Edition: doi.org/10.1002/ange.202003685Unprecedented Kinetic Inertness for a Mn²⁺-Bispidine Chelate: A Novel Structural Entry for Mn²⁺-Based Imaging Agents

Daouda Ndiaye, Maryame Sy, Agnès Pallier, Sandra Mème, Isidro de Silva, Sara Lacerda, Aline M. Nonat, Loïc J. Charbonnière,* and Éva Tóth*

Abstract: The search for more biocompatible alternatives to Gd³⁺-based MRI agents, and the interest in ⁵²Mn for PET imaging call for ligands that form inert Mn²⁺ chelates. Given the labile nature of Mn²⁺, high inertness is challenging to achieve. The strongly preorganized structure of the 2,4-pyridyl-disubstituted bispidol ligand L₁ endows its Mn²⁺ complex with exceptional kinetic inertness. Indeed, MnL₁ did not show any dissociation for 140 days in the presence of 50 equiv. of Zn²⁺ (37°C, pH 6), while recently reported potential MRI agents MnPyC3A and MnPC2A-EA have dissociation half-lives of 0.285 h and 54.4 h under similar conditions. In addition, the relaxivity of MnL₁ (4.28 mM⁻¹ s⁻¹ at 25°C, 20 MHz) is remarkable for a monohydrated, small Mn²⁺ chelate. In vivo MRI experiments in mice and determination of the tissue Mn content evidence rapid renal clearance of MnL₁. Additionally, L₁ could be radiolabeled with ⁵²Mn and the complex revealed good stability in biological media.

Introduction

The high diagnostic value of contrast agents makes them indispensable for many magnetic resonance imaging protocols. For 35 years now, Gd-complexes have been used in millions of human examinations and are considered among the safest diagnostic drugs. However, the recent emergence of nephrogenic systemic fibrosis and its causal link to Gd-exposure, as well as the evidence on brain and bone accumulation of Gd have alerted the medical community.^[1] In response to these safety concerns, some of the linear Gd³⁺ chelates have been recently withdrawn and the use of others has been restricted. In this context, the replacement of Gd³⁺

with more biocompatible, safer paramagnetic metal ions has become a major objective.

Being an essential metal ion, as well as a good relaxation agent due to its five unpaired electrons (in the high spin state), slow electron spin relaxation, and fast water exchange, Mn²⁺ is an obvious alternative.^[2] Indeed, recent years have witnessed increasing interest in Mn²⁺ complexes as potential MRI agents.^[3] In addition, manganese has a positron-emitting radioisotope, ⁵²Mn, with interesting decay properties for positron emission tomography (PET) (*t*_{1/2} = 5.6 d, max. β⁺-energy = 575 keV). Given its low β⁺ decay intensity (29.6%), PET resolution as good as 1.2 mm could be achieved, which is particularly important in small animal imaging.^[4] The long *t*_{1/2} value makes ⁵²Mn particularly adapted to image slow biological processes. Altogether, Mn²⁺ is the unique metal ion to offer detection capabilities in both MRI and PET.^[5]

Thermodynamically stable and kinetically inert complexation of Mn²⁺ is indispensable to avoid in vivo release of the free metal ion, which could potentially cause toxicity during MRI for which large contrast agent quantities are needed, or lead to off-target signals in PET examinations. In addition, for good MRI efficiency, the complex should contain at least one inner sphere water molecule. However, the lower charge (with respect to Gd³⁺) and the lack of ligand-field stabilization energy for the high-spin d⁵ electron configuration are not favorable to achieve high thermodynamic stability.

The highly labile nature of Mn²⁺ sets an even more difficult challenge to meet. Generally, ligand rigidity and preorganization promote kinetic inertness, and indeed, the most promising Mn²⁺ complexes are based on rigidified linear or macrocyclic chelators (Scheme 1). For instance, the *trans*-1,2-cyclohexylene backbone and the pyridine function ensure rigidity and are essential structural elements to provide slow dissociation of the MnPyC3A chelate (Scheme 1), a potential Mn²⁺-based agent which has successfully passed to in vivo experiments.^[3a,6] Among macrocyclic chelates, the non-hydrated MnDOTA was reported to have high inertness,^[7] while the monohydrated [Mn(cisDO2A)] was found already circa 20-fold more labile (dissociation half-lives, *t*_{1/2}, estimated to 1061 h and 48 h, respectively, at pH 7.4).^[8]

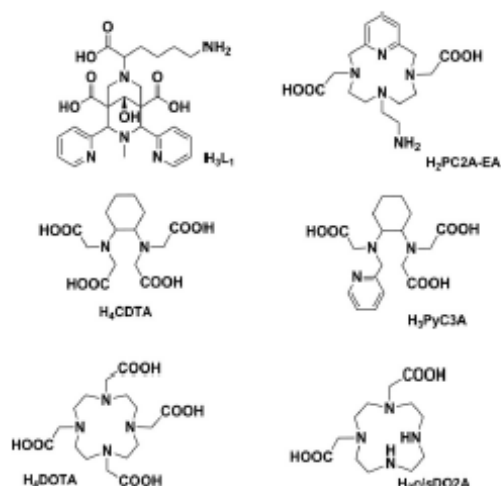
Recently, derivatives of the pyridine-containing pycen macrocycle were found to form stable and very inert Mn²⁺ chelates.^[3c] With *t*_{1/2} = 8 × 10³ h estimated for pH 7.4, the Mn(PC2A-EA) complex bearing an ethyleneamine pendant arm and proposed as a pH-sensitive agent, has the highest resistance to dissociation ever reported for a monohydrated Mn²⁺ complex. Nevertheless, this dissociation half-life re-

[*] D. Ndiaye, A. Pallier, Dr. S. Mème, Dr. S. Lacerda, Dr. É. Tóth
Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301, Université
d'Orléans
rue Charles Sadron, 45071 Orléans (France)
E-mail: eva.jakabtoth@cns-orleans.fr

M. Sy, Dr. A. M. Nonat, Dr. L. J. Charbonnière
Equipe de Synthèse Pour l'Analyse, Université de Strasbourg, CNRS,
IPHC UMR 7178
67000 Strasbourg (France)
E-mail: L.Charbonn@unistra.fr

I. de Silva
CEMHTI, CNRS UPR3079, Université d'Orléans
45071 Orléans 2 (France)

Supporting information and the ORCID identification number(s) for
the author(s) of this article can be found under:
https://doi.org/10.1002/anie.202003685.



Scheme 1. Ligands discussed.

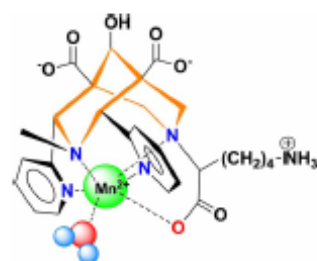
mains a million times below the value for GdDOTA ($t_{1/2} = 2.7 \times 10^9$ h, pH 7.4 and 25 °C).

With the aim of substantially improving the kinetic inertness of Mn^{2+} chelates while ensuring good relaxation properties and water solubility, we are exploring bispidine (3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonane) derivatives. Bispidine-type ligands represent a versatile platform in coordination chemistry.^[9] Pendant arms with varying coordinating functions can be attached in different positions to the bicyclic amine core in order to tune the coordination properties for metal ions of various sizes, coordination numbers, or coordination geometries. Depending on the substituents, the ligand can adopt different conformations and configurations.^[10] Among those, the chair-chair conformer is best suited for stable metal coordination and thanks to its exceptionally preorganized structure, bispidine derivatives tend to form very inert complexes. Bispidine complexes have been investigated with a large variety of metal ions and for different applications. Concerning Mn^{2+} , the very scarce reports involve pyridine derivative bispidine ligands and are restricted to studies in the solid state or in non-aqueous solvents.^[11]

We hypothesized that the 2,4-pyridyl-disubstituted bispidol derivative L_1 bearing one methylene carboxylic acid (Scheme 1) could be a good chelator for Mn^{2+} . First, the very rigid bispidine scaffold can endow MnL_1 with high kinetic inertness. The ligand is expected to coordinate in a five-dentate manner, involving two pyridine and two bispidine nitrogens as well as the methylene carboxylate. This leaves one coordination site for a water molecule, important for MRI application. The non-coordinating pending carboxylates might additionally create a second sphere contribution and increase proton relaxivity. Finally, L_1 can be readily functionalized for biological targeting via the lysine terminal amine. This scaffold has been previously investigated for the complexation of $^{64}Cu^{2+}$ ^[12] and $^{68}Ga^{3+}$ ^[13]. A three dimensional

representation of the putative structure of the MnL_1 complex is shown in Scheme 2.

We evidence here that despite a moderate thermodynamic stability, MnL_1 has a resistance to acid catalyzed dissociation and transmetalation, which is unprecedented for a Mn^{2+} chelate. In addition, the relaxation efficiency of the complex was assessed by a combined ^{13}O NMR and NMRD study. The complex was injected into mice and its biodistribution and pharmacokinetics were monitored by MRI. Finally, the ^{55}Mn radiolabelling of L_1 was explored and the stability of the radiocomplex was investigated.

Scheme 2. Three-dimensional representation of the putative structure of MnL_1 .

Results and Discussion

Thermodynamic Stability and Kinetic Inertness of MnL_1

L_1 was synthesized in 4 steps as previously reported.^[12] Ligand protonation constants were obtained by pH potentiometry and are reported in Table 1. By analogy to other bispidine ligands,^[14] we attributed the first protonation constant to one of the tertiary amine groups, while the other amine of the bispidine skeleton remains likely unprotonated in the chair-chair conformation.^[14b] Further protonation steps supposedly occur on the lysine amine ($\log K_{112} = 10.31$, typical of the lysine ϵ amine protonation constant)^[15] and then on the

Table 1. Ligand protonation constants, stability constants of ML complexes and pMn values. Values in parenthesis correspond to one standard deviation.

	L_1	PyC3A ^[14]	trans-CDTA ^[14]	PC2A-EA ^[14]
$\log K_{11}$	11.44 (1)	10.16	9.54	11.34
$\log K_{12}$	10.31 (2)	6.39	5.97	8.93
$\log K_{13}$	4.71 (5)	3.13	3.60	6.91
$\log K_{14}$	2.76 (5)	–	2.52	1.97
$\log K_{15}$	2.22 (4)	–	1.46	–
$\Sigma \log K_{1i}$	31.5	19.68	23.09	18.25
$\log K_{ML}$	12.21 (5)	14.14	14.32	19.01
$\log K_{MHL}$	10.42 (3)	2.43	2.90	6.88
$\log K_{MHL}$	3.87 (4)	–	1.89	2.50
$\log K_{2ML}$	15.59 (3)	–	16.75	–
$\log K_{2MHL}$	10.33 (2)	–	2.57	–
$\log K_{2MHL}$	3.28 (1)	–	–	–
pMn ^[a]	6.65	8.17	8.68	9.27

[a] pMn calculated for $\alpha_{ML} = \alpha_E = 10^{-5}$ M; pH 7.4.

three carboxylates, while the pyridine nitrogen atoms are not protonated above pH 2. Thermodynamic stability constants of MnL_1 and ZnL_1 were assessed by pH potentiometry (Table 1). In the case of Mn^{2+} , slow complex formation prevented direct titration; therefore, batch samples were prepared (Supporting Information, Figure S1). MnL_1 is three orders of magnitude less stable than ZnL_1 , in accordance with the Irving–Williams series. Figure 1 depicts the species distribution for MnL_1 as a function of pH, supported by the pH-dependent relaxivity values. Protonated complexes form with both Zn^{2+} and Mn^{2+} ; the first protonation constants are practically identical to the $\log K_{\text{HL}}$ values of the ligand and correspond to the protonation of the non-coordinating lysine amine. The similarity between the second protonation constant of the ligand and $\log K_{\text{MnHL}}$ or $\log K_{\text{ZnHL}}$ values further supports the attribution of the ligand protonation steps. At physiological pH, this species protonated on the lysine ϵ amine is the only complex present.

The stability of MnL_1 is relatively modest, as shown by the pMn value of 6.65 calculated for 10^{-5} M Mn^{2+} and L_1 concentration and pH 7.4 (Table 1). Nevertheless, once the chelate is formed, it has an exceptional resistance to dissociation. Kinetic inertness of metal complexes is typically assessed by transmetalation experiments with endogenously available metal ions, such as Zn^{2+} , which is present at circa $10\ \mu\text{M}$ in the blood and represents the most abundant potential competitor of Mn^{2+} . Different transmetalation protocols have been reported for Mn^{2+} complexes, some allowing a simple comparison of the kinetic inertness under given conditions, others giving also access to the underlying dissociation mechanisms. We followed transmetalation in the presence of 10 or 50 equivalents of Zn^{2+} , at pH 6 (50 mM MES buffer), 37°C , in a similar way to that proposed by Caravan et al.^[3a] At either of the Zn^{2+} concentrations, MnL_1 did not show any relaxivity change for the 140 days of observation (Figure 2). Under similar conditions (37°C , pH 6.0, 25 Zn^{2+} equivalents), dissociation half-lives, $t_{1/2}$, of 0.285 h and 54.4 h have been reported, respectively for MnPyC3A ^[3a] and MnPC2A-EA ,^[3c] two reference compounds considered as potential MRI probes with good kinetic inertness. Analogous experiments have been carried out at more acidic pH values

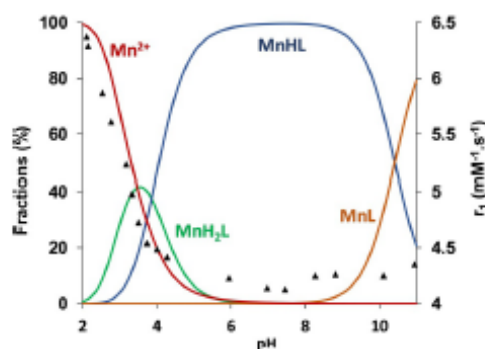


Figure 1. Species distribution curves calculated for MnL_1 (1 mM) and pH-dependent relaxivity values (▲) measured at 25°C , 60 MHz.

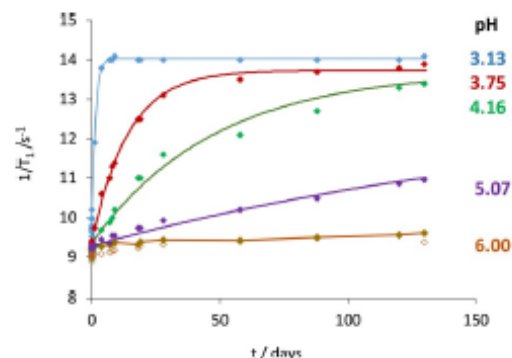


Figure 2. Time-dependent variation of the longitudinal proton relaxation rates in a 1 mM MnL_1 solution at 37°C and 60 MHz, 0.1 M KCl, in the presence of 50 equivalents of Zn^{2+} . Empty symbols at pH 6.00 correspond to 10 equivalents of Zn^{2+} . The curves represent the fit of the experimental data to yield the observed rate constants, k_{obs} .

as well (pH 3.1–6.0, 50 equivalents Zn^{2+} , 37°C ; Figure 2). Under these pseudo-first-order conditions, the dissociation rate constant, k_{obs} , has been determined, and the estimated transmetalation half-lives vary between 22.7 h at pH 3.13 and 130 days at pH 5.07.

The inertness of MnL_1 was also assessed in highly acidic solutions where the dissociation is much faster (0.01 – 1.0 M HCl , 25°C ; Figure 3). The dissociation rate constants, k_{obs} , show a second-order dependence on the proton concentration and could be fitted to Equation (1):

$$k_{\text{obs}} = k_0 + k_1[\text{H}^+] + k_2[\text{H}^+]^2 \quad (1)$$

The fit resulted in $k_1 = (1.6 \pm 0.1) \times 10^{-3}\text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ and $k_2 = (5.0 \pm 0.1) \times 10^{-4}\text{ s}^{-1}\text{M}^{-2}$, while k_0 was fixed to 0, otherwise the fit yielded a negative value with a large error (-3.5 ± 2) $\times 10^{-5}\text{ s}^{-1}$. We should note that the k_{obs} values determined above in the Zn^{2+} transmetalation study in the pH 3.1–5.1 interval also show a second-order dependence on $[\text{H}^+]$ (Figure S2), with $k_1 = (2.2 \pm 0.2) \times 10^{-3}\text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$, in the same order of magnitude as the one above. This rate constant, characteriz-

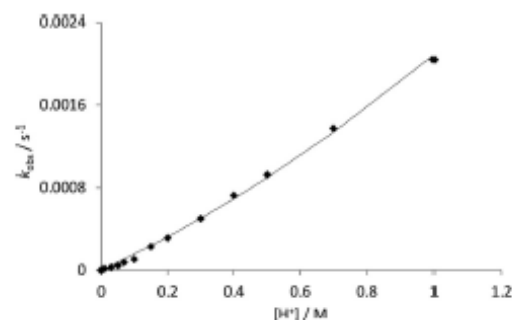


Figure 3. Pseudo-first-order rate constants determined for the dissociation of MnL_1 in acidic solutions. The curve corresponds to the fit of the experimental data to Equation (1) as explained in the text.

ing the proton assisted dissociation pathway, is two orders of magnitude lower than that reported for MnPC2A-EA, which is the most inert hydrated Mn²⁺ chelate reported so far.^[3c] At this point, it is difficult to extrapolate the dissociation half-life of the complex for physiological conditions, and in particular, more data are needed to describe the role of metal-assisted dissociation processes in the overall dissociation. These studies are in progress, but they take a long time due to the extremely low dissociation rates. Nevertheless, we can conclude that the rigid and preorganized bispidine skeleton provides very high kinetic inertness, unprecedented for a Mn²⁺ chelate.

Relaxation Properties of MnL₁

Proton relaxivity values have been recorded for MnL₁ as a function of the magnetic field, at 25 and 37 °C, in water (pH 7) and in human serum (Figure 4a and Figure S3). The NMRD data were complemented by variable temperature ¹⁷O relaxation rate measurements (Figure 4b), which give access to the hydration number and the water exchange parameters. The relaxivity is remarkably high for a Mn²⁺ complex ($r_1 = 4.28 \text{ mm}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $3.37 \text{ mm}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at 25 °C and 37 °C, respectively, 20 MHz, pH 7 in water). In comparison, relaxivity values of 3.3 and $2.5 \text{ mm}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (20 MHz, 25 and 37 °C) and $3.52 \text{ mm}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (20 MHz, 25 °C) were reported for the monohydrated complexes MnPCy3A and MnPC2A-EA. One hydration water molecule is confirmed for MnL₁ from

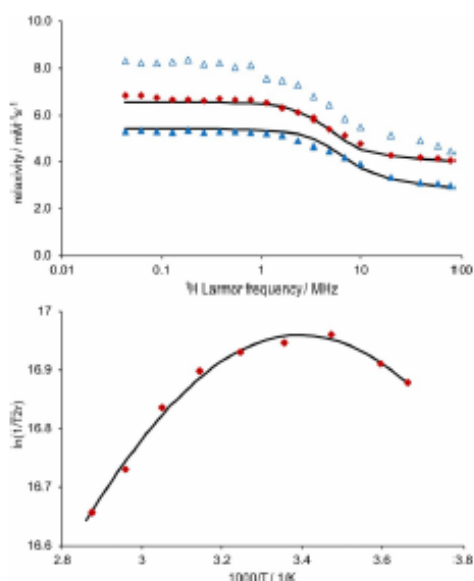


Figure 4. a) Proton relaxivity values of MnL₁ measured in water at 25 °C (red ★) and 37 °C (blue ▲) and in human serum at 37 °C (blue △), and b) reduced transverse ¹⁷O relaxation rates (9.4 T). The lines represent the simultaneous fit of the experimental points as explained in the text.

the temperature-dependent ¹⁷O transverse relaxation rates using the method of Gale et al. ($q = 0.85$; Figure S4).^[17]

The temperature-dependent transverse ¹⁷O relaxation rates and the NMRD profiles have been analysed in the frame of the Solomon–Bloembergen–Morgan theory to determine the parameters describing water exchange and rotational dynamics. The fit yielded $k_{\text{ex}}^{298} = (5.1 \pm 0.7) \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ and $\Delta H^\ddagger = 10.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ for the rate and the activation enthalpy of the water exchange. The water exchange rate is similar to that reported for MnPyC3A ($k_{\text{ex}}^{298} = 5.4 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$)^[3a] while it is about ten times lower than k_{ex}^{298} on MnEDTA ($k_{\text{ex}}^{298} = 47 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$).^[19] The bispidine MnL₁ chelate is structurally very different from other previously studied Mn²⁺ complexes, and the reason for this relatively slow water exchange is difficult to identify. Nevertheless, this exchange rate remains high enough not to limit proton relaxivity. The rotational correlation time, $\tau_R^{298} = (100 \pm 2) \text{ ps}$, is higher than the values reported for small molecular weight Mn²⁺ complexes (e.g., 56 ps for MnEDTA).^[19] This might reflect that τ_R is overestimated due to second sphere contribution to relaxivity from the non-coordinating carboxylates. Therefore, we also performed the analysis of the NMRD data by including an additional contribution from a second sphere relaxation mechanism to the overall relaxivity. To describe this second sphere mechanism, we assumed two 2nd sphere water molecules (with an estimated Mn–H proton distance of 3.2 Å, 50 ps residence time, and an activation enthalpy of 10 kJ mol⁻¹, based on previous simulations on Gd³⁺ complexes; see Figure S5 and the Supporting Information for all details).^[20] This resulted in a rotational correlation time, $\tau_R^{298} = (72 \pm 4) \text{ ps}$, which seems more reasonable on the basis of the molecular weight of the complex. This is obviously not a firm proof of a second sphere relaxivity contribution; nevertheless, it is evident that the relaxivity values measured tend to be higher than the typical values reported for monohydrated Mn²⁺ chelates.

The relaxivity values remain identical in the presence of up to 50 equivalents of citrate, carbonate, and phosphate (Figure S6). They increase to 6.46 and $5.12 \text{ mm}^{-1} \text{ s}^{-1}$ in human serum at 25 and 37 °C, respectively (20 MHz, Figure 4a), a tendency similar to that observed for instance for MnPyC3A and attributed to low affinity binding to serum proteins.

⁵²Mn Radiolabeling of L₁

The need for long-lived β⁺-emitting isotopes and the emergence of a combined PET-MRI technology have recently promoted an increasing interest in the production and complexation of ⁵²Mn. We have produced and purified ⁵²Mn at the cyclotron of the Orléans CNRS campus (see the Supporting Information for details). ⁵²Mn was recovered as ⁵²MnCl₂ solution after purification through 2 anion exchange resin AG[®] 1-X8 columns. The radiolabelling of L₁ was tested under different conditions of pH, temperature, and ⁵²Mn/L₁ ratio. The radiolabelling reactions were followed by radio-TLC at 5, 15, 30, and 60 min. All reactions were performed in the presence of ascorbic acid to prevent any oxidation reaction. Optimized reaction conditions were obtained for

pH 7, 70°C, 1 h, achieving 99% labelling yield. $^{52}\text{MnL}_1$ is highly hydrophilic with a $\log P = -1.96 \pm 0.06$, which falls within the range reported for other Mn complexes, for example, MnDPDP or $\text{Mn}(\text{EDTA-BTA})$ with $\log P$ values of -3.07 and -1.84 , respectively.^[21] The in vitro stability of the radiocomplex was assessed in different media at pH 7.4 (water, PBS and saline (0.9% NaCl)) and in the presence of 0.6 mM HSA (Figure 5), revealing its stability in all media up to 18 h, and a slightly lower to moderate stability at 24 h.

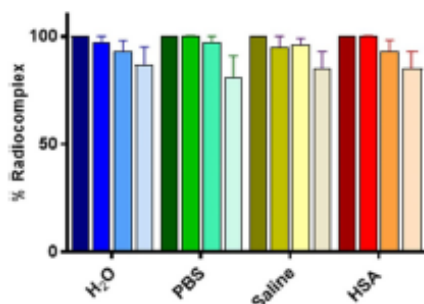


Figure 5. In vitro stability of $^{52}\text{MnL}_1$ in different media at pH 7.4 (water, PBS and saline (0.9% NaCl)) and in the presence of 0.6 mM HSA, at different time points: 0, 1, 18 and 24 h (darker to lighter colour, respectively).

MRI Biodistribution and Pharmacokinetics of MnL_1

To validate the potential in vivo use of MnL_1 , we have evaluated the biodistribution in wild type mice by MRI at 7 T. The signal intensity of the main organs (kidney, liver, muscle, lung) and the aorta was followed during 1 h post intravenous injection (0.06 mmol kg^{-1} dose; Figure S7). Figure 6 depicts normalized signal intensity for the analyzed organs. The highest signal intensity was reached around 4 min after injection. MnL_1 shows renal clearance and the uptake in the liver is limited. The estimated blood half-life is 21 min, typical of small molecules and similar to previously reported contrast agents.^[3,22] This distribution profile was further confirmed by ex vivo ICP-OES measurements performed at the end of the MRI experiment. The data are compared to mice that did not receive any MnL_1 injection (control) for which the Mn-levels measured correspond to endogenous Mn (Figure 7; Table S1).

At 1.5 h post injection, higher Mn content is found in the kidneys and blood of injected mice. The blood uptake could be related to the low affinity binding of MnL_1 to blood proteins, as also observed by relaxivity measurements. Compared to the Mn tissue content reported for MnPyC3A at 24 h post injection, our complex shows lower liver and kidney uptake.^[3a]

Conclusion

We demonstrate herein that despite a relatively modest thermodynamic stability, the MnL_1 complex has an exceptional resistance to dissociation. At 37°C, pH 6.0 and in the

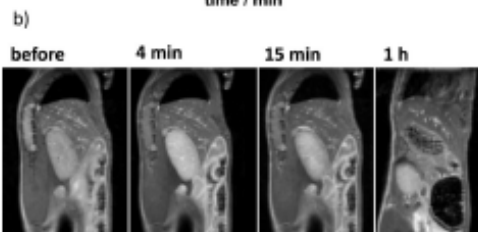
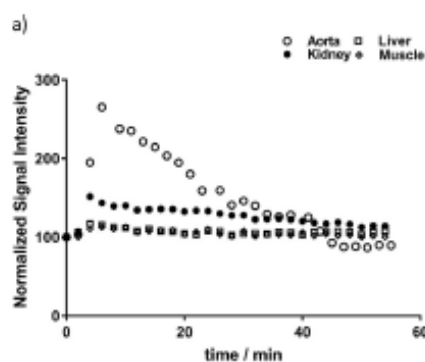


Figure 6. a) Normalized signal intensity in the kidney muscle, liver, and aorta plotted as a function of time. Measurements were performed every 2 minutes for 4 mice. Standard deviations are not presented for better readability. b) Sagittal T1-weighted MR images prior to injection and at 4, 15 min and 1 h post intravenous injection of 0.06 mmol kg^{-1} of MnL_1 .

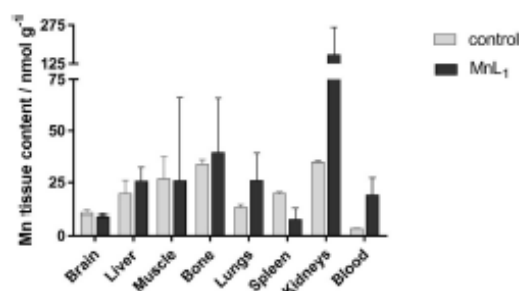


Figure 7. Ex vivo ICP-OES quantification of the Mn tissue content in the main organs and blood of control and injected mice with MnL_1 (1.5 h post injection). Data is presented in nmol g^{-1} tissue \pm SD ($n=3$).

presence of up to 50 equivalents of Zn^{2+} , MnL_1 remained intact and did not show any relaxivity change for at least 140 days. MnL_1 has one inner sphere water molecule. It has higher proton relaxivity values than most monohydrated, small molecular weight Mn^{2+} chelates, which might be related to a second sphere relaxivity contribution induced by the non-coordinating carboxylate functions.

In vivo MRI experiments performed in mice indicated quick renal clearance, which was also supported by ex vivo ICP determination of the Mn tissue content in different

organs. L_1 could be successfully labeled with ^{52}Mn and the radiocomplex has good stability in biological media. Based on these preliminary radiolabeling experiments, the conjugation of the bifunctional ligand L_1 to biomolecules, such as antibodies can be envisaged. Indeed, for the imaging of such slowly circulating biomolecules, the long-lived ^{52}Mn PET isotope represents a clear advantage.

In summary, the bispidine-based L_1 chelator constitutes a very promising structural entry for the development of Mn-based imaging agents for MRI as well as for PET. Alternatively, this bispidine synthon can be also attractive for the design of combined PET-MRI probes. Such bimodal imaging applications based on Mn^{2+} might be interesting when the in vivo fate of the imaging probe is to be followed for a longer period of time. Most importantly, the L_1 ligand can provide excellent kinetic inertness, which so far could not be achieved within the more traditional ligand families.

Acknowledgements

The authors thank the French National Research Agency (grant ANR-18-CE18-0008) for funding. We thank Dr. Frederic Szeremeta and Quentin Mura for their assistance with MRI experiments and Louis Frealle with the ^{52}Mn production.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: ^{52}Mn · contrast agents · kinetic inertness · manganese · MRI

[1] a) T. Gröbner, *Nephrol. Dial. Transplant.* **2006**, *21*, 1104–1108; b) E. Di Gregorio, G. Ferrauto, C. Furlan, S. Lanzardo, R. Nuzzi, E. Gianolio, S. Aime, *Invest. Radiol.* **2018**, *53*, 167–172.
[2] B. Drahoš, I. Lukeš, É. Tóth, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, 1975–1986.
[3] a) E. M. Gale, I. P. Atanasova, F. Blasi, I. Ay, P. Caravan, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 15548–15557; b) M. Botta, F. Carniato, D. Esteban-Gomez, C. Platas-Iglesias, L. Tei, *Future Med. Chem.* **2019**, *11*, 1461–1483; c) R. Botár, E. Molnár, G. Trencsényi, J. Kiss, F. K. Kálmán, G. Tircsó, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 1662–1666; d) Z. Garda, E. Molnár, F. K. Kálmán, R. Botár, V. Nagy, Z. Baranyai, E. Brücher, Z. Kovács, I. Tóth, G. Tircsó, *Front. Chem.* **2018**, *6*, 14; e) E. Molnár, N. Camus, V. Pařinec, G. A. Rolla, M. Botta, G. Tircsó, F. K. Kálmán, T. Fodor, R. Tripić, C. Platas-Iglesias, *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 5136–5149; f) A. Rodríguez-Rodríguez, Z. Garda, E. Ruscsák, D. Esteban-Gómez, A. de Blas, T. Rodríguez-Blas, L. M. P. Lima, M. Beyler, R. Tripić, G. Tircsó, C. Platas-Iglesias, *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 5017–5031; g) C. Vanasschen, E. Molnár, G. Tircsó, F. K. Kálmán, É. Tóth, M. Brandt, H. H. Coenen, B. Neumaier, *Inorg. Chem.* **2017**, *56*, 7746–7760.

[4] L. M. Carter, A. L. Kesner, E. C. Pratt, V. A. Sanders, A. V. F. Masicano, C. S. Cutler, S. E. Lapi, J. S. Lewis, *Mol. Imaging Biol.* **2020**, *22*, 73–84.
[5] C. M. Lewis, S. A. Graves, R. Hernandez, H. F. Valdivinos, T. E. Barnhart, W. Cai, M. E. Meyerand, R. J. Nickles, M. Suzuki, *Theranostics* **2015**, *5*, 227–239.
[6] D. J. Erstad, I. A. Ramsay, V. C. Jordan, M. Sojoodi, B. C. Fuchs, K. K. Tanabe, P. Caravan, E. M. Gale, *Invest. Radiol.* **2019**, *54*, 697–703.
[7] B. Drahoš, V. Kubiček, C. S. Bonnet, P. Hermann, I. Lukeš, É. Tóth, *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 1945–1951.
[8] Z. Garda, A. Forgács, Q. N. Do, F. K. Kálmán, S. Timári, Z. Baranyai, L. Tei, I. Tóth, Z. Kovács, G. Tircsó, *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *163*, 206–213.
[9] a) A. M. Nonat, A. Roux, M. Sy, L. J. Charbonnière, *Dalton Trans.* **2019**, *48*, 16476–16492; b) P. Comba, M. Kerscher, W. Schiek in *Progress in Inorganic Chemistry*, Vol. 55 (Ed.: K. D. Karlin), **2007**, pp. 613–704; c) P. Comba, M. Kerscher, K. Rueck, M. Starke, *Dalton Trans.* **2018**, *47*, 9202–9220.
[10] T. Legdali, A. Roux, C. Platas-Iglesias, F. Camerel, A. M. Nonat, L. J. Charbonnière, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 11167–11176.
[11] a) P. Comba, B. Kanellakopoulos, C. Katsichtis, A. Lienke, H. Pritzkow, F. Rominger, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1998**, 3997–4001; b) P. Comba, H. Rudolf, H. Wadehoff, *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 2724–2736; c) P. Comba, M. Kerscher, M. Merz, V. Müller, H. Pritzkow, R. Remenyi, W. Schiek, Y. Xiong, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 5750–5760.
[12] A. Roux, R. Gillet, S. Huclier-Markai, L. Ehret-Sabatier, L. J. Charbonnière, A. M. Nonat, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 1475–1483.
[13] T. Price, S. Yap, R. Gillet, H. Savoie, L. Charbonnière, R. Boyle, A. Nonat, G. J. Stasiuk, *Chem. Eur. J.* **2020**, <https://doi.org/10.1002/chem.201905776>.
[14] a) G. D. Hosken, R. D. Hancock, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 1363–1364; b) R. Gillet, A. Roux, J. Brandel, S. Hudier-Markai, F. Camerel, O. Jeannin, A. M. Nonat, L. J. Charbonnière, *Inorg. Chem.* **2017**, *56*, 11738–11752.
[15] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, 5th ed., W. H. Freeman, New York, **2002**.
[16] E. Molnár, B. Váradi, Z. Garda, R. Botár, F. K. Kálmán, É. Tóth, C. Platas-Iglesias, I. Tóth, E. Brücher, G. Tircsó, *Inorg. Chim. Acta* **2018**, *472*, 254–263.
[17] E. M. Gale, J. Zhu, P. Caravan, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18600–18608.
[18] J. Maigut, R. Meier, A. Zahl, R. van Eldik, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14556–14569.
[19] G. A. Rolla, C. Platas-Iglesias, M. Botta, L. Tei, L. Helm, *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 3268–3279.
[20] A. Borel, L. Helm, A. E. Merbach, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 600–610.
[21] M. K. Islam, S. Kim, H.-K. Kim, S. Park, G.-H. Lee, H. J. Kang, J.-C. Jung, J.-S. Park, T.-J. Kim, Y. Chang, *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 2993–3001.
[22] a) J. Wang, H. Wang, I. A. Ramsay, D. J. Erstad, B. C. Fuchs, K. K. Tanabe, P. Caravan, E. M. Gale, *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 8811–8824; b) F. La Cava, A. Fringuello Mingo, L. Miragoli, E. Terreno, E. Cappellotti, L. Lattuada, L. Poggi, S. Colombo Serra, *ChemMedChem* **2018**, *13*, 824–834.

Manuscript received: March 11, 2020

Revised manuscript received: April 6, 2020

Accepted manuscript online: April 16, 2020

Version of record online: May 18, 2020

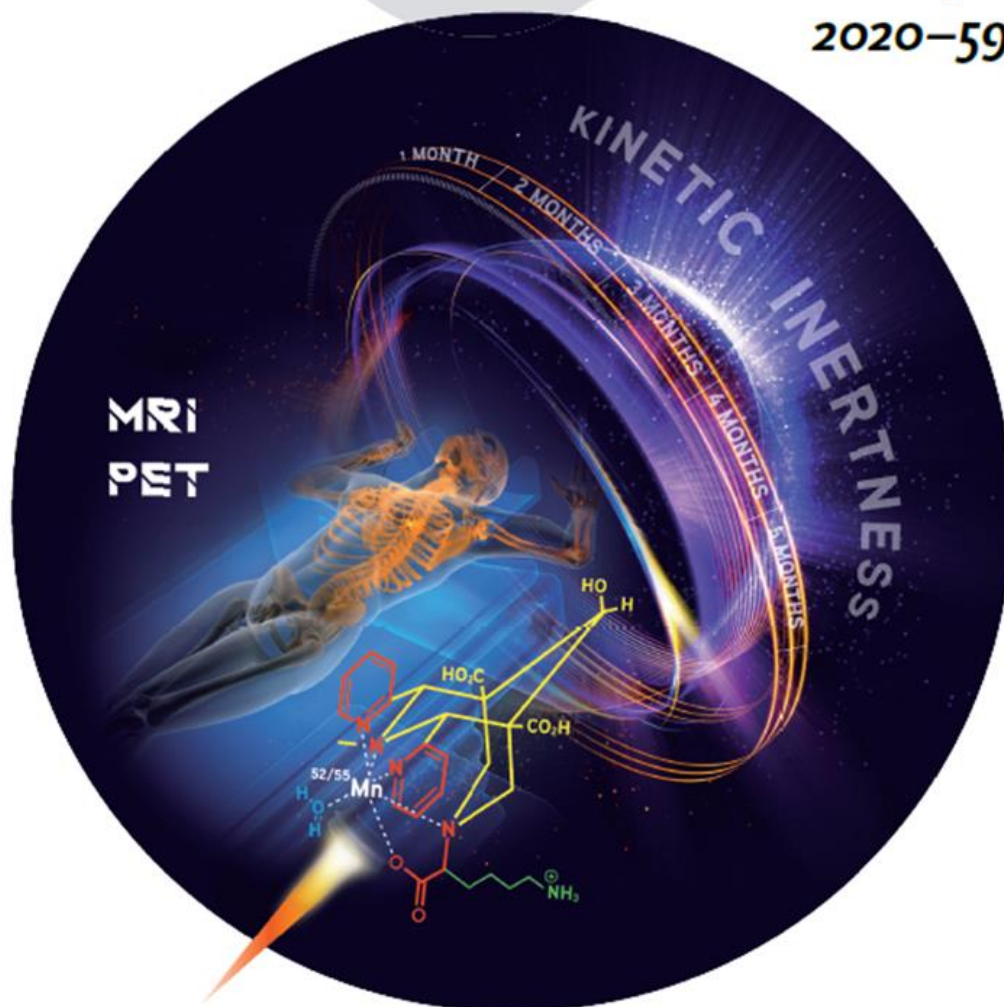
A Journal of the German Chemical Society

Angewandte Chemie

GDCh
International Edition



www.angewandte.org
2020–59/29



Mn²⁺ complexes ...

... are more biocompatible alternatives to Gd³⁺-based MRI agents, and ⁵²Mn is an emerging radionuclide for positron emission tomography. Both applications require highly inert chelates, which, given the labile nature of Mn²⁺, remains a challenge. In their Research Article on page 11958, L. J. Charbonnière, Tóth, and co-workers demonstrate that a strongly preorganized 2,4-pyridyl-disubstituted bispidol ligand provides exceptional kinetic inertness to its Mn²⁺ complex.

WILEY-VCH

Daouda NDIAYE

Complexes de manganèse (Mn^{2+}) par des ligands de type bispidine pour des applications en imagerie médicale (IRM, TEP)

Résumé

Suite aux récentes inquiétudes de santé publique concernant la possible toxicité des agents de contraste IRM à base de gadolinium (Gd^{3+}), l'utilisation d'un autre métal paramagnétique, plus biocompatible, est devenue un enjeu majeur. Etant un métal essentiel, le manganèse(II) est l'alternative la plus crédible. De plus, grâce à son radioisotope $^{52}Mn^{2+}$, il constitue le seul élément qui offre la possibilité d'une détection à la fois en IRM et en TEP.

Dans ce contexte, l'objectif de la thèse était la conception et la caractérisation de complexes de Mn^{2+} thermodynamiquement stables, cinétiquement très inertes et qui possèdent également une bonne relaxivité. Ainsi, une dizaine de ligands de type bispidine ont été étudiés. Ces derniers sont caractérisés par une structure fortement pré-organisée et rigide, parfaitement adaptée à la taille et donc à la coordination du Mn^{2+} . Les études potentiométriques, spectroscopiques (RMN, UV-Vis) et cinétiques ont révélé une modulation fine de la stabilité et de l'inertie des complexes en fonction des groupements fonctionnels et de leur position sur le bicycle. Nous avons pu identifier le chélate monohydraté de Mn^{2+} le plus inerte connu à ce jour, ainsi que les premiers ligands qui ont une réelle sélectivité pour le Mn^{2+} vis-à-vis du Zn^{2+} , à l'encontre de l'ordre prédit par la série d'Irving-Williams. Certains chélates de Mn^{2+} présentent une excellente relaxivité, confirmée également par des études IRM *in vivo* chez la souris. Enfin, un radiomarquage des ligands au $^{52}Mn^{2+}$ a pu être réalisé.

Mots clés : manganèse, bispidine, IRM, agent de contraste, inertie cinétique, stabilité thermodynamique, ^{52}Mn .

Manganese (Mn^{2+}) complexes based on bispidine ligands for medical imaging applications (MRI, PET)

Abstract

Following recent toxicity concerns about Gd^{3+} -based MRI contrast agents, the replacement of Gd^{3+} with a more biocompatible paramagnetic metal ion has become an important research objective. Manganese(II) is an essential element and represents the most evident alternative. Moreover, $^{52}Mn^{2+}$ is an interesting PET radioisotope which makes manganese the unique metal ion that allows for both MRI and PET detection.

In this context, the main objective of this thesis was to design and characterize thermodynamically stable and kinetically highly inert Mn^{2+} complexes based on bispidine ligands, which also have good relaxation properties. We have explored a dozen of bispidine chelators endowed with a strongly pre-organized and rigid structure, which is perfectly adapted to the size and thus to the coordination of Mn^{2+} . Potentiometric, spectroscopic (UV-Vis, NMR) and kinetic studies have revealed a fine modulation of the stability and the kinetic inertness of the complexes depending upon the nature and the position of the functional groups attached to the bispidine bicycle. Most importantly, we could identify a Mn^{2+} chelate with an unprecedented kinetic inertness. We have also described ligands which form Mn^{2+} complexes considerably more stable than those with Zn^{2+} . They represent the first examples of real discrimination between these metals, going against the order predicted by the Irving-Williams series. Some systems have excellent relaxation efficiency for a monohydrated Mn^{2+} complex, which was also confirmed by *in vivo* MRI experiments in mice. Finally, we also succeeded in radiolabeling some bispidine ligands with $^{52}Mn^{2+}$.

Keywords : manganese, bispidine, MRI, contrast agent, kinetic inertness, thermodynamic stability, ^{52}Mn .



CENTRE BIOPHYSIQUE MOLECULAIRE
CNRS, UPR 4301
RUE CHARLES SADRON, 45071 ORLEANS CEDEX 2

