Complexes métalliques pour utilisation en imagerie médicale : application à la maladie d'Alzheimer

Diego Santo Domingo Porqueras

▶ **To cite this version:**

Diego Santo Domingo Porqueras. Complexes métalliques pour utilisation en imagerie médicale : application à la maladie d'Alzheimer. Matériaux. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCD016 . tel-01771728

HAL Id: tel-01771728

https://theses.hal.science/tel-01771728

Submitted on 19 Apr 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Sorbonne Paris Cité

UNIVERSITÉ PARIS 13

N° attribué par la bibliothèque

/_/_/_/_/_/_/_/_/_/

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

SORBONNE PARIS CITE - PARIS 13

Discipline : Chimie

Présentée et soutenue publiquement

Par

Diego SANTO DOMINGO PORQUERAS

Le 12 décembre 2016

Complexes métalliques pour utilisation en imagerie médicale : application à la maladie d'Alzheimer

Directrice de thèse :

Mme Milena SALERNO

Jury

M. Fabien Gosselet	Université d'Artois	Rapporteur
Mme. Christelle Hureau	Université de Toulouse	Rapporteur
M. Philippe Savarin	Université Paris 13	Examinateur
Mme. Jolanda Spadavecchia	Université Paris 13	Examinateur
M. Raphaël Tripier	Université de Bretagne Occidentale	Examinateur
Mme. Milena Salerno	Université Paris 13	Directrice de thèse

Thèse préparée au

Laboratoire CSPBAT

UFR de Santé, médecine et biologie humaine

Université Paris 13

74, rue Marcel Cachin

93017 Bobigny CEDEX

COMPLEXES METALLIQUES POUR UTILISATION EN IMAGERIE MEDICALE : APPLICATION A LA MALADIE D'ALZHEIMER

Résumé

La détection du peptide bêta-amyloïde (Aβ) avec des techniques d'imagerie médicale est utilisée pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer. Des complexes métalliques de cuivre et des lanthanides pourraient être utilisés à ce propos, en supposant qu'ils soient capables d'entrer au cerveau.

Nous avons étudié la cytotoxicité et la cinétique d'incorporation intracellulaire de deux complexes macrocycliques ayant des bras picolinates, $[Eu(do2pa)]^+$ et $[Cu(te1pa)]^+$. Les deux complexes sont capables de traverser la membrane plasmique des cellules K562 et K562/ADR. Le rapport entre la concentration intracellulaire et la concentration extracellulaire est de 5 et 1,4 respectivement. Aucune différence significative concernant l'accumulation intracellulaire n'a été trouvée entre les cellules K562 et K562/ADR, ce qui suggère que ces composés ne sont pas des substrats de la P-gp, la protéine d'efflux la plus étudiée au niveau de la barrière hémato-encéphalique. Ces résultats et les propriétés physicochimiques des complexes suggèrent que ces deux complexes pourraient être intéressants pour la production d'agents d'imagerie médicale visant le cerveau.

A partir de la structure du complexe $[Cu(te1pa)]^+$, nous avons synthétisé un complexe métallique visant le peptide Aβ par la liaison d'un dérivé d'aryl-benzofuranne (appelé ONO) au bras picolinate du ligand grâce à une réaction de Buchwald-Hartwig. L'ONO est un marqueur des plaques amyloïdes qui est capable de traverser la membrane plasmique des cellules K562 et K562/ADR. Ni l'ONO ni le $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$ ne sont toxiques sur les cellules SH-SY5Y aux concentrations appropriées pour l'utilisation clinique.

Finalement, nous avons aussi étudié une série de N-alkanol-N-cyclohexanol amine aryl esters, synthétisés comme inhibiteurs de la P-gp. Tous les inhibiteurs ont des $[I]_{0,5}$ entre 60 nM et 510 nM, montrant une inhibition efficace de l'activité de la P-gp. Les inhibiteurs sont de 3 à 27 fois plus efficaces que le vérapamil, les isomères *trans* étant plus efficaces que leurs homologues *cis*.

METAL COMPLEXES FOR MEDICAL IMAGING: APPLICATION TO ALZHEIMER'S DISEASE

Abstract

Detection of beta-amyloid peptide (Aβ) using medical imaging techniques is used for the diagnosis of Alzheimer's disease. Copper and lanthanide metallic complexes may be used for that goal, if they were able to enter the brain.

We studied the cytotoxicity and the cellular incorporation kinetics of two macrocyclic complexes with picolinate arms, $[Eu(do2pa)]^+$ and $[Cu(te1pa)]^+$. Both complexes are able to cross the plasma membrane, entering K562 and K562/ADR cells. The ratios between their intracellular and extracellular concentrations are 5 and 1.4 respectively. No significant difference was observed between K562 and K562/ADR cells, meaning that these complexes are not substrates of P-gp, a well-known efflux transport protein in the blood-brain barrier. The results obtained and the physicochemical properties of complexes suggest that the complexes studied are appropriate platforms for the synthesis of brain-targeted medical imaging agents.

Based on the structure of $[Cu(te1pa)]^+$, an Aβ-targeted metallic complex was developed by attaching an aryl-benzofuran derivative (named ONO) to the picolinate arm of the ligand via a Buchwald-Hartwig reaction. ONO is a marker of amyloid plaques that is able to cross the plasma membrane of K562 and K562/ADR cells. Neither ONO nor $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$ are toxic to SH-SY5Y cells at concentrations that would be appropriate for clinical use.

Finally, we studied a series of N-alkanol-N-cyclohexanol amine aryl esters, synthesized as P-gp inhibitors. All inhibitors have $[I]_{0.5}$ between 60 nM and 510 nM, showing good P-gp inhibition activity. The P-gp inhibitors are 3 to 27 times more powerful than verapamil, being the *trans* isomers more effective than their *cis* counterparts.

COMPLEJOS METÁLICOS PARA IMAGEN MÉDICA: APLICACIÓN A LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Resumen

La detección del péptido beta-amiloide (Aβ) mediante técnicas de imagen médica se utiliza en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Complejos metálicos de cobre y de lantánidos podrían ser utilizados con este objetivo, si fueran capaces de entrar en el cerebro.

Hemos estudiado la citotoxicidad y la cinética de incorporación intracelular de dos complejos macrocíclicos con brazos picolinato, $[Eu(do2pa)]^+$ y $[Cu(te1pa)]^+$. Ambos complejos son capaces de cruzar la membrana plasmática de las células K562 y K562/ADR. La proporción entre la concentración intracelular y la extracelular es de 5 y 1,4 respectivamente. No se encontró ninguna diferencia significativa en la acumulación intracelular entre las células K562 y K562/ADR, lo que sugiere que estos compuestos no son sustratos de la P-gp, la proteína de transporte más estudiada en la barrera hematoencefálica. Estos resultados, junto a las propiedades fisicoquímicas de los complejos, sugieren que estos dos complejos serían interesantes de cara a la producción de agentes de imagen médica para utilización intracerebral.

A partir de la estructura del $[Cu(te1pa)]^+$, hemos sintetizado un complejo metálico que tiene por objetivo el péptido Aβ, mediante la unión de un derivado de aril-benzofurano (llamado ONO) al brazo picolinato del ligando gracias a una reacción de Buchwald-Hartwig. El ONO es un marcador del péptido Aβ, capaz de atravesar la membrana plasmática de las células K562 y K562/ADR. Ni el ONO ni el $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$ son tóxicos para las células SH-SY5Y en concentraciones que serían adecuadas para la utilización clínica.

Por último, también hemos estudiado una serie de N-alcanol-N-cyclohexanol-amino aril ésteres, sintetizados como inhibidores de la P-gp. Todos los inhibidores tienen $[I]_{0,5}$ entre 60 nM y 510 nM, lo que demuestra una inhibición eficaz de la actividad de P-gp. Los inhibidores son entre 3 y 27 veces más potentes que el verapamilo, siendo los isómeros *trans* más eficaces que los homólogos *cis*.

A mon grand-père Marcos Porqueras Moreno.

« Quien no teme a un lunes, no teme a Dios »
Qui ne craint pas un lundi, ne craint pas Dieu.

Remerciements

Je me souviens bien de mon arrivée à Paris. J'avais passé une nuit sans sommeil, pleine d'illusions pour retrouver ce que Paris allait m'offrir. Endormi, l'œil à moitié fermé, assis à l'intérieur d'un lent train de nuit, avec trois valises, un sandwich de tortilla, et beaucoup d'espoir, je suis arrivé à celle qui a été ma ville pendant ces dernières années. J'ai la sensation d'avoir beaucoup changé pendant ces années, mais « así como todo cambia, que yo cambie no es extraño ». A Paris, et à Brest, j'ai connu des gens extraordinaires qui m'ont ouvert l'esprit. A eux je dis merci, car sans eux, cette thèse n'aurait été possible.

En premier lieu, je veux remercier ma directrice de thèse, *mi jefa*, Milena Salerno. C'est elle qui m'a encouragé, jour après jour, à faire un travail systématique, sérieux, patient et clair, et qui a illuminé mes pires journées avec son sourire et ses blagues. Il est difficile de trouver une personne plus laborieuse et disciplinée, toujours prête à aider et à conseiller sur les problèmes abondants qui apparaissent dans la vie du doctorant, que ce soit dans la vie personnelle ou dans la recherche scientifique. Milena a été une directrice extraordinaire, d'un côté, et une amie pour moi, de l'autre. Je la remercierai toujours infiniment pour ceci.

Je remercie sincèrement Monsieur Fabien Gosselet, professeur à l'Université d'Artois, Madame Christelle Hureau, chargée de recherche CNRS à l'Université de Toulouse, Monsieur Philippe Savarin, professeur à l'Université Paris 13, Madame Jolanda Spadavecchia, chargée de recherche CNRS à l'Université Paris 13, et Monsieur Raphaêl Tripier, professeur à l'Université de Bretagne Occidentale, pour avoir accepté d'examiner mon travail.

J'adresse toute ma gratitude aux amis et collègues qui ont écouté mes problèmes et qui ont partagé de longues conversations dans les couloirs du Bâtiment SMBH. Je remercie spécialement Iván Bello, qui m'a montré avec la plus grande patience les

techniques utilisées dans le laboratoire, et qui a partagé avec moi son expérience et son savoir-faire. Il a été le meilleur des guides, spécialement dans mes premiers jours comme doctorant. De plus, je veux remercier de tout mon cœur les autres doctorants qui ont exploré ce chemin à mes côtés, Corentine, Margery, Sophie, Inga, Shivalika, Romain, Raymond, Sadequa, Katya, Zhicheng, Hanane, Chloé, Anouchka, Nico… mais aussi le reste de membres du laboratoire Chimie, Structure et Propriétés de Biomatériaux et d'Agents Thérapeutiques (CSPBAT). Etre content dans l'environnement de travail est le point de départ d'une bonne thèse. Mes collègues ont ensoleillé mes jours avec leurs sourires et gentillesse.

Malgré la pluie, toujours présente, j'ai savouré mon séjour à Brest. J'ai profité de l'opportunité de vivre la recherche en chimie organique avec des chercheurs très efficaces, créatifs et passionnés. Dès le premier jour, je me suis senti comme chez moi dans les laboratoires de l'UBO. Je remercie Raphaël Tripier de m'avoir accueilli chaleureusement et d'avoir collaboré très intensément dans mes travaux de recherche. Je n'oublierai jamais sa sympathie et ses conseils, toujours précis. Je remercie aussi spécialement Maryline Beyler pour sa capacité didactique et son énorme patience. Elle m'a montré ses secrets de la recherche en chimie organique, et j'ai essayé d'absorber le plus possible. Je remercie aussi mes chers *españoles por el mundo*, Aurora Rodriguez et Isidoro López, avec lesquels j'ai partagé beaucoup de bonnes expériences et aussi beaucoup de pizza. Je me rappelle aussi les autres membres du laboratoire, toujours agréables et prêts à collaborer et aider. J'ai passé de très bons moments à Brest, et je suis reconnaissant pour cela.

Je remercie aussi Kamilia Zedek pour son intérêt et son aide pendant son stage de master au sein de notre laboratoire. L'opportunité de lui montrer le quotidien de la recherche scientifique m'a aidé à structurer mes pensées. Aussi, je remercie Youcef Frarma et Zebda Hireche, qui ont partagé quelques mois avec nous.

Aussi, je remercie spécialement Olivier Gager, pour avoir partagé son expérience dans le travail de laboratoire avec moi. Ses raisonnements toujours lucides et son énorme rigueur dans les travaux expérimentaux m'ont fait comprendre l'importance

d'affronter les problèmes toujours présents dans la science calmement, avec esprit critique, et analyse. De plus, je remercie Chatchanok Udomtanakunchai pour son fort sourire, principalement, mais aussi pour avoir partagé son savoir-faire pour les dernières expériences réalisées dans cette thèse doctorale. Également, je suis très reconnaissant à Alban Moyeux et Gérard Cahiez pour les discussions instructives dans le terrain de la synthèse organique.

Comme disait Iñigo Errejón, « une thèse doctorale, ce n'est pas la boxe mais le jeu d'échecs». Effectivement, il existe de nombreux échecs pendant une thèse, mais aussi des énormes sourires quand on obtient le bon produit, le bon résultat, la bonne publication. C'est le moment d'ouvrir les bouteilles de *licorka*, et de les partager avec les potes.

Le temps passé au sein de la Cité Universitaire de Paris, dans le Collège d'Espagne, la Maison du Cambodge et la Fondation Suisse, m'a donné l'opportunité de connaître des chercheurs et étudiants de toutes les nationalités et domaines. Avec eux j'ai partagé des discussions intéressantes autour du petit déjeuner et du dîner, qui ont motivé ma capacité critique. J'ai compris avec eux que les problèmes des chercheurs sont souvent les mêmes dans n'importe quel domaine.

Je me souviens spécialement de mi *presi* Teresa Marcos, mi *presi 2.0* Estefanía Calvo, mon cher « Don Luis Mejía » Mike Ortiz, toute la famille du voyage à Normandie notamment mes chères infantes d'Almeria, NuriPé et ses vins blancs, NuriCé et ses haches, notre querido líder Charlie, les diners avec les rufians, les discussions sur cinéma avec Isabel Alvarez Rico, Santos, et tant d'autres, les matchs de foot avec Juanma, el pucelano Adriano Martín, el Rubo et tous les autres, les pacharáns avec la Vane, tous les artistes et musiciens du Cole, les cours d'espagnol pratique avec les « brasas » : meine kleine Karo Ott, Sarah, Nikiforos, Jenya et le pirate Joachim, l'expertise chimique d'Alba, les soldats paleochrétiens de Javi et Gerard, Antonia et ses tangos, les actuations musicales réalisées par Diego Llusía et qui sont déjà part du patrimoine du Colesp, la padrísima Ingrid –no mameeees ! - les adorables

Navarro et Mosi, les discussions philosophiques avec Agustín, Roberto et David R. Valeiras, le sake de Cris, les blagues de Miguel Escobedo, nire neskak Ruth eta Nerea, l'esprit de Pío Baroja, les organisateurs de la Semaine de la Science, les soirées musicales complétées par le « veeeeeelero », le joueurs de Dixit de madrugada, les karaokés du Fleurus, Clint Eastwood *et al.*, les fondues des amis de Le Corbusier, et, en général, tous ceux qui ont eu une attitude assez rufiana.

Dans un nouvel paragraphe –tu l'as mérité !- je remercie Marta Garcia Cortés pour avoir partagé avec moi tout le soleil de l'Espagne, qui est dans son sourire.

Je remercie aussi mes amis à distance, spécialement les lions de Parquesol et les coreligionnaires de la Novena, ainsi que Hada, Kathy, mon frère Joseda, Ine, Andrea, Emo, Valle, Eulate, et tant d'autres amis. Dans le premier groupe, j'aimerais remercier spécialement mon cher ami et voisin Fernando Martín. Aussi, je veux remercier le support du club de fans de Manuadna, les vieux potes de Quimiska, qui m'ont fait sourire souvent avec leurs longs courriels pleins d'énergie, de blagues, et de cœurs ouverts. Miguel Velázquez, Jaime Martín, Germán Molpeceres, Inmaculada Fuertes, Mario Ruiz, et oui, toi aussi, Gabri de la +, merci à tous et bonne chance avec vos nouvelles aventures ! Même si le chemin est dur et les orages font peur, on termine toujours par arriver à bon port.

Comme dit la chanson traditionnelle de Castille, « de la bonne vigne vient la bonne grappe ». Avec une sincérité absolue, je remercie l'amour et le soutien de ma famille, de mes oncles et tantes, de mes grands-parents. Leur importance n'a pas été atténuée par la distance, et je les ai eus dans mes pensées chaque jour.

Merci Padre, Madre, Clara, Nala.

Je remercie Saint Albert le Grand pour sa présence continue sur mon bureau.

Finalement, je remercie scihub.bz et le démineur de l'ordinateur du spectromètre d'absorption atomique, sans lesquels cette thèse n'aurait jamais pu être finie.

Liste d'abréviations

Aβ : Peptide bêta-amyloïde

ABC : ATP binding cassette

Ac : Acétate

ACN : Acétonitrile

APOE : Apolipoprotéine E

APP : Protéine précurseur de l'amyloïde *(Amyloid precursor protein)*

Ar- : Aromatique

ATP : Adénosine-5′-triphosphate

BHE : Barrière hémato-encéphalique

BCRP : Protéine de résistance au cancer mammaire *(Breast cancer resistance protein)*

Boc : Tert-butoxycarbonyle

Boc-OSucc : Tertbutyl-(oxycarbonyloxy)succinimide

Ce : Concentration extracellulaire

Ci : Concentration intracellulaire

cyclam : 1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane

cyclen : 1,4,7,10-tétraazacyclododécane

DCM : Dichlorométhane

DMF : N,N-diméthylformamide

DMSO : Diméthylsulfoxyde

do2pa : acide 6,6'-((1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,7-diyl)bis(méthylène)) dipicolinique

do3a : Acide 4,7,10-tris-carboxyméthyl-,1,4,7,10-tetraaza-cyclododéc-1-yl]-acétique

dota : Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacétique

dtpa : Acide diéthylènetriaminepentaacétique

EMA : *European Medicines Agency*

EtOH : Ethanol

FCCP : Carbonylcyanure-4-(trifluorométhoxy)phénylhydrazone

F_{cyto} : Intensité de fluorescence mesurée par cytométrie de flux

FDA : *Food and Drug Administration*

FDG : ^{18}F-fluorodésoxyglucose

FSN : Fibrose systémique néphrogénique

HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance *(high performance liquid chromatography*

IP : Iodure de propidium

IRM : Imagerie par résonance magnétique

MeOH : Methanol

MDR : Résistance multiple aux médicaments *(Multi-drug résistance)*

NBD : Domaine d'union avec l'ATP (*Nucleotide binding domain)*

pcta : Acide 3,6,9,15-tétraazabicyclo[9.3.1]pentadéca-1(15),11,13-triène-3,6,9,-triacétique

PBS : Tampon phosphate salin (*Phosphate buffered saline)*

PiB : Pittsburg Compound B

P-gp : P-glycoprotéine

RMN : Résonance magnétique nucléaire

SAA : Spectroscopie d'absorption atomique

SNC : Système nerveux central

TCL : Trouble cognitif léger

te1pa : Acide 6-((1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan-1-yl)méthyl)picolinique

TEMP : Tomographie d'émission monophotonique

TEP : Tomographie d'émission de positrons

TMD : Domaines transmembranaires *(Trans-membrane domains*)

TMR : Tétraméthylrosamine

UNV : Unité neurovasculaire

$\Delta\psi_{mbr}$: Potentiel de la membrane plasmique

$\Delta\psi_{mit}$: Potentiel de la membrane mitochondriale

Sommaire

Introduction 17

Chapitre 1. La maladie d'Alzheimer 21

1.1 Généralités et épidémiologie de la maladie 22

1.2 La neuropathologie de la maladie 24

1.2.1 Les dégénérescences neurofibrillaires 25

1.2.2 Les plaques amyloïdes 26

1.3 Le peptide β-amyloïde 26

1.4 L'origine du peptide β-amyloïde 28

1.5 L'hypothèse de la cascade amyloïde 31

1.6 La barrière hémato-encéphalique 33

1.7 La famille des transporteurs ABC. 38

1.8 La P-glycoprotéine 40

1.9 La BHE et la P-gp dans la maladie d'Alzheimer 43

1.10 Le diagnostic de la maladie d'Alzheimer. 44

Chapitre 2. Imagerie médicale et maladie d'Alzheimer 47

2.1 Les biomarqueurs dans la maladie d'Alzheimer 48

2.2 Les biomarqueurs dans le liquide cérébro-spinal 50

2.3 Les techniques d'imagerie pour la détection de la maladie d'Alzheimer. 51

2.4 La tomographie d'émission 54

2.4.1 La tomographie par émission de positrons 54

2.4.2 La tomographie d'émission monophotonique 58

2.5 L'imagerie par résonance magnétique 59

2.6 Les agents de contraste pour l'IRM 61

2.7 La visualisation des plaques amyloïdes par IRM en utilisant des agents de contraste 64

2.7.1 Les agents de contraste non-spécifiques 64

2.7.2 Les agents de contraste spécifiques 64

2.8 Les molécules pour ^{19}F IRM 71

2.9 Utilisation intracérébrale des complexes métalliques 71

Chapitre 3. Matériels et méthodes 73

3.1 Produits chimiques 74

3.2 Appareils utilisés. 76

3.3 Logiciels 78

3.4 Protocoles de synthèse chimique 79

3.4.1 Synthèse de la 4-(5-méthoxybenzofuran-2-yl)aniline (ONO) 79

3.4.2 Synthèse du 4-chloro-6-(chlorométhyl)picolinate de méthyle 82

3.4.3 Synthèse de $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$ 86

3.5 Les lignées cellulaires K562 et K562/ADR 94

3.6 La lignée cellulaire SH-SY5Y 96

3.7 Tests de viabilité cellulaire avec le bleu de trypan 96

3.8 Etude du transport de la pirarubicine par la P-gp. 96

3.9 Etude de l'inhibition de la P-gp 99

3.10 Tests de cytotoxicité des complexes métalliques et de l'ONO. 100

3.10.1 Tests de cytotoxicité : évaluation de la croissance cellulaire des cellules K562 et K562/ADR 100

3.10.2 Tests de cytotoxicité dans des cellules SH-SY5Y 100

3.11 Dosage de la concentration d'Eu^{3+} libre 102

3.12 Incorporation des complexes métalliques dans les cellules. 103

3.13 Evaluation de l'élimination du potentiel mitochondrial par le FCCP 104

3.14 Incorporation de l'ONO dans les cellules 105

Chapitre 4. Incorporation intracellulaire des complexes $[Eu(do2pa)]^+$ et $[Cu(te1pa)]^+$ 107

4.1 Importance du transport intracellulaire 108

4.2 Les tétraazamacrocycles 109

4.3 Le complexe $[Eu(do2pa)]^+$ 110

4.4 Le complexe $[Cu(te1pa)]^+$ 112

4.5 Stabilité thermodynamique et cinétique 114

4.6 Etude de l'incorporation intracellulaire d'$[Eu(do2pa)]^+$ et $[Cu(te1pa)]^+$ et leur cytotoxicité 117

4.7 Résultats et discussion 119

4.7.1 $[Eu(do2pa)]^+$ 121

4.7.2 $[Cu(te1pa)]^+$ 122

4.7.3 Contrôles 124

4.8 Considérations sur la charge et la lipophilie 126

4.9 Conclusion 128

Chapitre 5. Synthèse du complexe $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$, caractérisation optique et cytotoxicité 131

5.1 Objectif de la synthèse 132

5.2 Synthèse de l'ONO 133

5.3 Synthèse du $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$ 137

5.3.1 Synthèse du bras picolinate 141

5.3.2 Protection du macrocycle et insertion du bras picolinate 143

5.3.3 Couplage et déprotection du macrocycle 146

5.4 Caractérisation optique de l'ONO et du $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$ 149

5.5 Etude de la cytotoxicité et de l'incorporation intracellulaire de l'ONO dans les cellules K562 et K562/ADR 156

5.5.1 Etude de la cytotoxicité de l'ONO 156

5.5.2 Etude de l'incorporation intracellulaire de l'ONO 157

5.6 Etude de la cytotoxicité de l'ONO et du $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$ dans des cellules neuronales 158

5.7 Conclusion 160

Chapitre 6. Inhibiteurs de la P-gp 163

6.1 L'inhibition de la P-gp dans la MDR 164

6.2 Rôle de la P-gp dans la BHE 166

6.3 L'inhibition de la P-gp dans la BHE 168

6.4 Molécules étudiées 168

6.5 Résultats et discussion 170

Conclusions 173

Perspectives 177

Bibliographie 181

Introduction

Cette thèse doctorale s'inscrit dans le contexte de l'utilisation de complexes métalliques, pour la détection des plaques amyloïdes présentes dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, en utilisant des techniques d'imagerie médicale.

Avant le développement des techniques d'imagerie, la visualisation des plaques amyloïdes n'était possible qu'avec l'examen post mortem du tissu cérébral. Aujourd'hui, deux techniques d'imagerie : la tomographie d'émission de positrons (TEP) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) sont utilisées pour contribuer au diagnostic de la maladie *in vivo*.

Dans le cadre de l'utilisation de la TEP, le Pittsburg Compound B (PiB) est le radiotraceur visant les plaques amyloïdes le plus étudié. Le PiB utilise comme radioisotope le ^{11}C, dont la demi-vie est assez courte (20 minutes). Afin de pallier cette limitation, des autres radiotraceurs ont été développés à partir de l'isotope ^{18}F, qui a une demi-vie de 110 minutes. Cependant, la production de ces radioisotopes nécessite toujours la présence d'un cyclotron à proximité du lieu de l'examen.

D'autres radioisotopes, notamment des métaux, ont des demi-vies plus longues. Par exemple, le cuivre possède quatre isotopes utilisables en TEP: ^{60}Cu, ^{61}Cu, ^{62}Cu, et ^{64}Cu. ^{64}Cu a une demi-vie de 12,7 heures, très supérieure à celle de ^{11}C et ^{18}F. De plus, ^{64}Cu donne lieu à un meilleur rapport signal sur bruit que les autres isotopes. A l'heure actuelle il serait très intéressant d'établir des réseaux de production et de distribution de ces radiotraceurs. Ces avantages suggèrent que les radiotraceurs marqués au ^{64}Cu seraient des outils performants et adaptables en fonction de l'utilisation clinique en TEP.

L'IRM est utilisée aujourd'hui pour obtenir des images du cerveau et mesurer l'atrophie cérébrale, mais la sensibilité de cette technique ne permet pas de détecter les plaques amyloïdes dans l'environnement clinique. Cependant, l'utilisation d'agents de

contraste basés sur des chélates de Gd^{3+}, pourrait permettre la détection de ces plaques. Le paramagnétisme des chélates de Gd^{3+} permet de modifier localement le temps de relaxation des protons d'eau.

Des complexes de Gd^{3+} sont utilisés aujourd'hui en clinique comme agents de contraste pour l'acquisition d'images par IRM. Cependant, la plupart de ces complexes ont été dessinés pour une utilisation extracellulaire. Les agents de contraste commerciaux ne sont pas capables de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) et en conséquence, ne peuvent pas être utilisés pour l'imagerie cérébrale.

La liaison d'un complexe macrocyclique de cuivre ou de gadolinium à une molécule capable de détecter les plaques amyloïdes permettrait de cumuler : (i) les propriétés physicochimiques du métal qui le rende détectable grâce aux techniques d'imagerie médicale, (ii) la stabilité thermodynamique et cinétique suffisante des complexes pour l'utilisation sans risque des métaux dans le corps humain, et (iii) la capacité de se lier spécifiquement aux plaques amyloïdes, grâce à des molécules ayant une structure comportant des groupes aromatiques conjugués et des atomes donneurs d'électrons, capable de reconnaitre les régions hydrophobes présentes dans les plaques.

En dépit des avantages présentés par l'utilisation de complexes métalliques pour le marquage des plaques amyloïdes, aucun radiotraceur métallique pour le TEP ni agent de contraste pour l'IRM n'a été approuvé cliniquement et ce, notamment, parce que les composés développés à ce jour montrent une faible incorporation au niveau du cerveau.

Pour accéder au cerveau, ces complexes doivent traverser les cellules endothéliales de la BHE. De plus, la présence des protéines transporteurs d'efflux dans les membranes de ces cellules peut affecter à leur incorporation au niveau cérebrale, lorsque ces complexes seraient substrats de ces transporteurs. L'un des transporteurs le plus étudié est la P-glycoprotéine (P-gp), qui est caractérisée par une faible spécificité de substrats, transportant souvent des molécules chargées positivement et contenant des domaines hydrophobiques.

Dans ce contexte, trois objectifs ont été abordés dans cette thèse doctorale :

1. L'évaluation du transport intracellulaire et la cytotoxicité d'$[Eu(do2pa)]^+$ et de $[Cu(te1pa)]^+$, deux complexes macrocycliques ayant des bras picolinates, dans les cellules K562 et K562/ADR. La stabilité thermodynamique et cinétique et les propriétés physicochimiques de ces composés suggèrerent qu'ils pourraient être des bons candidats pour le développement d'agents de contraste intracellulaires pour l'IRM ou de radiotraceurs pour la TEP. De plus, ils sont capables de s'incorporer à l'intérieur des cellules et ne sont pas toxiques.
2. La conception et la synthèse d'un complexe de cuivre, le $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$, qui serait potentiellement utilisable comme radiotraceur pour la TEP dans le cadre de la détection des plaques amyloïdes au niveau du cerveau. Par ailleurs, l'évaluation de sa cytotoxicité et sa caractérisation optique.
3. La contribution au développement de nouveaux inhibiteurs de la P-glycoprotéine en étudiant leur effet sur le transport de la pirarubicine dans les cellules K562/ADR qui surexpriment cette protéine.

Cette thèse doctorale est divisée en chapitres :

Le chapitre 1 est consacré à la description de la maladie d'Alzheimer. Dans ce chapitre l'épidémiologie de la maladie est introduite, ainsi que ses caractéristiques neuropathologiques et le rôle du peptide amyloïde dans la maladie. Le rôle de la BHE est décrit, ainsi celui de la P-gp au niveau de la BHE. Finalement, le diagnostic de la maladie est introduit.

Il a été proposé que l'utilisation de biomarqueurs permettra, dans les années à venir, des fortes améliorations dans le diagnostic précoce de cette maladie. Dans le chapitre 2 une description des biomarqueurs les plus utilisés dans le milieu clinique est faite, suivi par une discussion plus approfondie sur l'utilisation de l'imagerie médicale pour

le diagnostic de la maladie d'Alzheimer, et notamment l'utilisation d'agents de contraste pour l'IRM et des radiotraceurs pour la TEP dans ce contexte.

Ensuite, le chapitre 3 détaille les matériaux et méthodes utilisés dans le travail expérimental conduit dans cette thèse, y compris les protocoles de synthèse des produits développés.

Le chapitre 4 expose les travaux réalisés concernant le transport intracellulaire et la cytotoxicité de deux complexes macrocycliques d'europium et cuivre avec des bras picolinates.

Après des résultats encourageants par rapport à l'incorporation intracellulaire des complexes métalliques, nous avons développé une voie de synthèse pour modifier le complexe $[Cu(te1pa)]^{+}$ avec un dérivé d'aryl-benzofuranne capable de détecter les plaques amyloïdes. Ensuite, nous avons évalué sa cytotoxicité et ses propiétés optiques en collaboration avec le Dr. Chatchanok Udomtanakunchai de l'Université Chiang Mai (Thaïlande). Ces travaux sont exposés dans le chapitre 5.

Finalement, dans le chapitre 6, nous retraçons l'étude d'une série de molécules sur l'inhibition de la P-glycoprotéine. Ces molécules ont été développées en collaboration avec le groupe d'Elisabetta Teodori à l'Università degli Studi di Firenze (Italie). Ce sont des N-alkanol-N-cyclohexanol amine aryl esters possèdant une chaine saturée de longueur variable et un cycle rigide de six carbones.

Chapitre 1.
La maladie d'Alzheimer

« Causa latet: vis est notissima »
L'effet est bien connu, mais la cause reste cachée.

Ovide, Metamorphose (4, 285)

1.1 Généralités et épidémiologie de la maladie

C'était l'année 1901 quand Auguste Deter, une femme de 51 ans atteinte d'une démence, fut admise à l'*Anstalt für Irre und Epileptische* à Francfort., Auguste Deter montrait une perte progressive de la mémoire, du déclin cognitif, souffrait de paranoïa et d'hallucinations ainsi que de problèmes de langage. Elle fut suivie par le docteur Alois Alzheimer qui documenta rigoureusement l'évolution de sa démence. Il étudia le cerveau d'Auguste Deter après son décès, et publia ses découvertes en 1907 (Alzheimer, 1907). En effet, l'étude du cerveau d'Auguste Deter, avec la technique de la coloration à l'argent (Bielschowsky, 1902 ; Ramón y Cajal, 1910), lui permit de mettre en évidence deux caractéristiques histopathologiques qui sont considérées, aujourd'hui, comme centrales pour la maladie : les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires (**Figure 1**) (Nelson *et al.*, 2012).

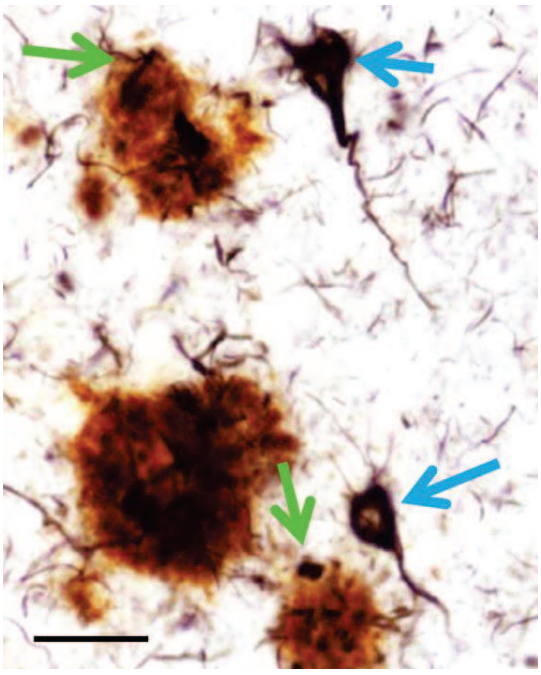


Figure 1 : Coloration immunohistochimique des plaques amyloïdes (flèches verts) et des dégénérescences neurofibrillaires (flèches bleus) dans une coupe du néocortex d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer. Echelle = 50 µm. Reproduit de (Nelson *et al.*, 2012) avec la permission de Oxford University Press.

Dans son article décrivant la démence d'Auguste Deter, Alois Alzheimer affirma : « Il y a certainement plus de maladies psychiatriques que celles incluses dans nos livres de texte » (Alzheimer, 1907 ; Stelzmann *et al.*, 1995). Effectivement, ce type de démence pris très rapidement le nom de son découvreur. Cependant, c'est seulement avec des recherches dans les années 50 et 60 que l'on a pu comprendre que la plupart des patients atteints de démence sénile, considérée antérieurement comme un processus naturel, montraient les mêmes caractéristiques histopathologiques que celles observées dans la maladie d'Alzheimer.

Ainsi, deux maladies séparées mais connectées ont été définies (Selkoe, 2001) : (i) la maladie d'Alzheimer familiale précoce, avec l'apparition des symptômes avant 65 ans et qui est toujours attribuée à une rare mutation sur un des trois gènes qui régulent la production du peptide β-amyloïde. Le cas d'Auguste Deter probablement faisait partie de ce groupe ; (ii) la maladie d'Alzheimer sporadique tardive, indiscernable pathologiquement de l'autre, dont les causes sont aujourd'hui inconnues. Elle représente la grande majorité des cas, et son incidence augmente exponentiellement avec l'âge. En effet, la plupart des cas se déclarent après 65 ans (**Figure 2**) (Alzheimer's Association, 2015).

La maladie d'Alzheimer est la plus importante des démences neurodégénératives. Elle est à l'origine d'approximativement deux tiers des cas de démence (Brookmeyer *et al.*, 2011 ; Alzheimer's Association, 2015). Cependant, dans approximativement la moitié des cas, la maladie d'Alzheimer coexiste avec d'autres démences, telles que la démence vasculaire, la dégénération frontotemporale ou la démence de corps de Lewy (Alzheimer's Association, 2015). Ces cas de « démence mixte » compliquent la définition des frontières de chaque maladie.

Avec une société dont le pourcentage de personnes âgées augmente chaque année, la maladie d'Alzheimer est un des défis les plus importants pour la recherche médicale du XXIe siècle. Une étude statistique a pronostiqué que le nombre de patients atteints

de cette maladie peut doubler chaque 20 ans au niveau mondial si la recherche médicale n'arrive pas à en freiner son incidence et ses effets (Brookmeyer *et al.*, 2007 ; Adlard *et al.*, 2014).

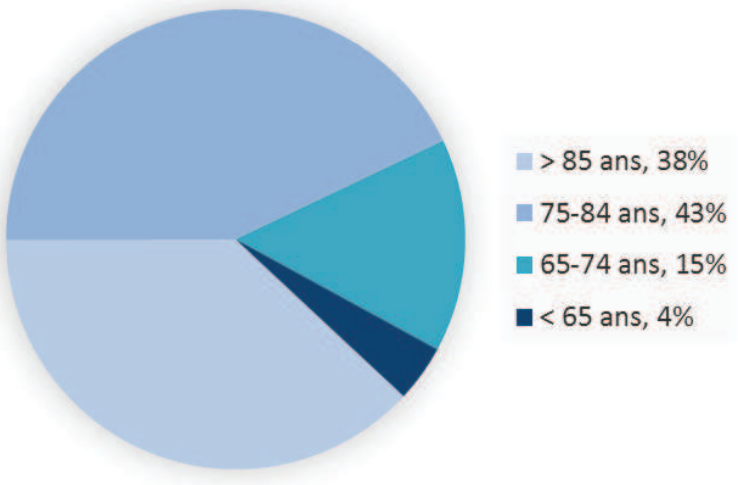


Figure 2 : Distribution en âge des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer. Le plus grand nombre de cas correspond aux patients âgés de plus de 65 ans (Hebert *et al.*, 2013).

1.2 La neuropathologie de la maladie

La recherche des processus biochimiques qui se déroulent chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer a motivé l'intérêt d'étudier, après leur décès, les cerveaux de ces patients. Au niveau macroscopique, le cerveau d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer et un cerveau sain présentent des différences. Par exemple, chez le cerveau du malade on observe une perte de poids due à la destruction de tissu cérébral, ainsi qu'une atrophie au niveau du cortex ou de l'hippocampe. Cependant, ces changements ne sont pas spécifiques à la maladie d'Alzheimer (Perl, 2010).

L'étude au microscope utilisant des colorants est beaucoup plus informative. Déjà Alois Alzheimer avait été capable d'identifier par cette méthode les deux lésions caractéristiques de la maladie, à savoir : (i) les plaques amyloïdes, composées

principalement de β-amyloïde ; (ii) les dégénérescences neurofibrillaires, causées par la formation d'agrégats de protéine tau hyperphosphorylée (Alzheimer, 1907 ; Perl, 2010 ; Serrano-Pozo *et al.*, 2011 ; Jack *et al.*, 2013 ; Frisoni *et al.*, 2013). Ces lésions sont considérées comme biomarqueurs de la maladie.

La dégradation du cerveau, dont un des symptômes est principalement la perte de la mémoire, est mesurable seulement de nombreuses années après l'apparition des premières structures histopathologiques (Braak et Braak, 1995 ; Jack *et al.*, 2010, 2013 ; Sperling, 2011 ; Lesné *et al.*, 2013). La distribution spatiale de ces processus est la même pour la maladie d'Alzheimer familiale précoce que pour la maladie d'Alzheimer sporadique tardive (Itagaki *et al.,* 1989 ; DeKosky et Scheff, 1990 ; Giannakopoulos *et al.,* 2003 ; Serrano-Pozo *et al.,* 2011 ; Blazquez-Llorca *et al.,* 2013 ; Musiek et Holtzman, 2015)

1.2.1 Les dégénérescences neurofibrillaires

Les dégénérescences neurofibrillaires sont causées par hyperphosphorylation de la protéine tau, ce qui origine la formation d'agrégats de cette protéine. Les taupathies, c'est-à-dire, les maladies neurodégénératives causées par ces structures, incluent de nombreuses maladies telles que le syndrome de Down, la démence frontotemporale, la maladie de Pick ou la maladie de Parkinson.

Dans le cerveau sain la protéine tau s'associe aux microtubules des cytosquelettes neuronaux. La liaison aux microtubules est fortement régulée par la phosphorylation de cette protéine au niveau des résidus sérine et thréonine. L'hyperphosphorylation de la protéine tau dans la maladie d'Alzheimer cause la dissociation de la protéine des microtubules, compromettant ainsi leur stabilisation et leur fonctionnement. La déstructuration des microtubules et la formation d'agrégats insolubles de protéine tau contribuent à la dégénérescence neuronale (LaFerla et Oddo, 2005 ; Blennow *et al.*, 2006 ; Serrano-Pozo *et al.*, 2011 ; Bloom, 2014).

La distribution spatiale des dégénérescences neurofibrillaires commence dans des structures du lobe temporal médian comme le cortex entorhinal ou l'hippocampe, pour ensuite continuer à travers le système limbique vers le néocortex (Braak et Braak, 1991 ; Serrano-Pozo *et al.*, 2011 ; Nelson *et al.*, 2012). Cette distribution est liée au grade de démence et permet donc d'établir une classification des différents stades de la maladie (Braak et Braak, 1991). L'atrophie corticale au niveau du lobe temporal médian est à l'origine des problèmes de mémoire épisodique caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (Squire et Zola-Morgan, 1991 ; Serrano-Pozo *et al.*, 2011).

1.2.2 Les plaques amyloïdes

Les plaques amyloïdes, anciennement connues comme plaques séniles, sont des agrégats extracellulaires composés principalement du peptide Aβ (Braak et Braak, 1991). Des agrégats amyloïdes impliquant d'autres protéines sont également présents dans d'autres maladies comme le diabète de type 2, la maladie de Huntington ou les maladies à prions. Une discussion sur la structure du peptide Aβ, son origine et son agrégation aura lieu plus loin.

Les plaques amyloïdes, à la différence des dégénérescences neurofibrillaires, s'accumulent principalement dans le néocortex. Le lobule temporal médian et le cervelet sont affectés plus faiblement et plus tard que le néocortex (Braak et Braak, 1991 ; Serrano-Pozo *et al.*, 2011).

1.3 Le peptide β-amyloïde

Le β-amyloïde (Aβ) est un peptide de 39 à 43 acides aminés, issu du clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP, *Amyloid precursor protein*). Les fragments les plus abondants chez l'humain sont ceux qu'on appelle Aβ (1-40) et Aβ (1-42), avec 40 et 42 acides aminés respectivement.

Dans la structure du peptide Aβ (1-42), la présence de 25 résidus hydrophobes lui confère une grande hydrophobicité (**Figure 3**). La forme Aβ (1-40) est dépourvue

d'acides aminés hydrophobes en positions 41 et 42, et est par conséquent plus faiblement hydrophobe. Dû à sa forte hydrophobicité, le peptide Aβ a tendance à s'agréger et à former des oligomères, puis des fibrilles qui se déposent dans le cerveau sous la forme des plaques amyloïdes (Selkoe, 2001 ; Rauk, 2009).

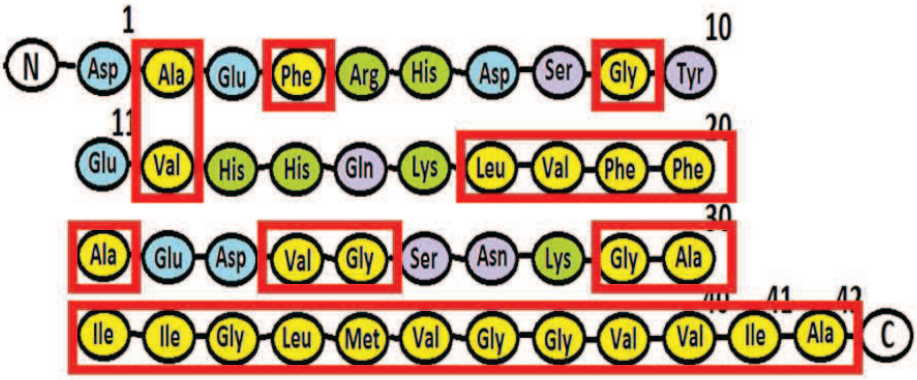


Figure 3 : Structure du peptide Aβ (1-42). Les acides aminés hydrophobes ont été marqués en rouge.

Lorsque la concentration d'Aβ (1-42) augmente, les monomères du peptide s'assemblent spontanément en dimères et trimères puis en oligomères de poids moléculaire plus élevé, comme l'Aβ*56, un dodecamère de l'Aβ (1-42). La concentration de cet oligomère dans le liquide cérébro-spinal est plus élevée dans le stade préclinique de la maladie, et diminue avec l'aggravation du déclin cognitif. L'Aβ*56 perturbe les processus cognitifs chez la souris indépendamment de l'apparition des plaques amyloïdes, et il montre une corrélation positive avec la présence de formes pathologiques de la protéine tau, ce qui suggère un rôle important dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer (Lesné *et al.*, 2006, 2013).

Les oligomères de faible poids moléculaire du peptide Aβ sont solubles dans le milieu extracellulaire, à la différence des fibrilles insolubles qui forment les plaques amyloïdes. Il existe une corrélation entre les concentrations d'oligomères solubles d'Aβ (1-42) et le déclin cognitif (Cheng *et al.*, 2007 ; Necula *et al.*, 2007 ; Balducci et

Forloni, 2014 ; Cerasoli *et al.*, 2015). Il semble de plus en plus clair que les oligomères solubles sont des espèces avec des structures secondaires différentes de celles des oligomères qui forment les fibrilles donnant lieu aux plaques amyloïdes (**Figure 4**).

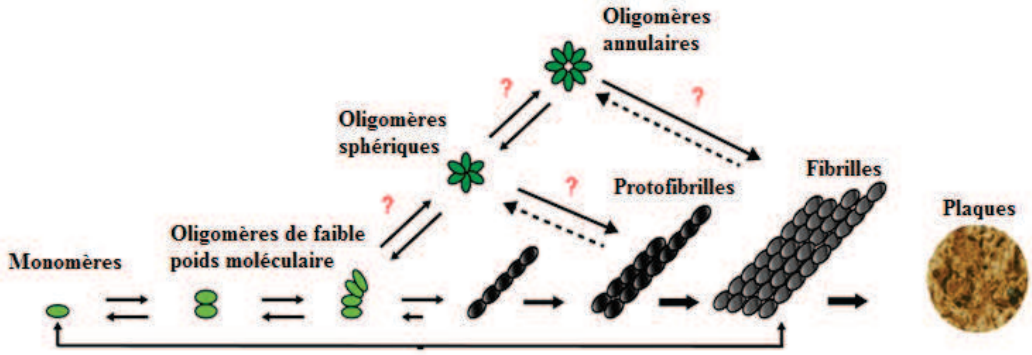


Figure 4 : Modèle simplifié d'agrégation du peptide Aβ. Modifié de (Kotler *et al.*, 2014) avec la permission de The Royal Society of Chemistry.

1.4 L'origine du peptide β-amyloïde

Comme nous l'avons mentionné auparavant, le peptide Aβ provient de la protéolyse de la protéine APP. Cette glycoprotéine transmembranaire est exprimée de façon ubiquitaire chez les mammifères, spécialement dans le cerveau (Zheng et Koo, 2011). Ses fonctions sont encore mal définies, mais elles pourraient être associées au développement et à la survie neuronale, à la réparation cellulaire et à la régulation des signaux intracellulaires et extracellulaires (Dawkins et Small, 2014). La protéine APP peut être clivée de deux façons : selon le chemin non-amyloïdogénique ou selon le chemin amyloïdogénique.

Le chemin non-amyloïdogénique, ne produisant pas de peptide Aβ, est le plus courant en absence de pathologie. Il commence par le clivage du domaine extracellulaire de la protéine APP, par l'enzyme α-sécrétase. Le fragment N-terminal est libéré dans le milieu extracellulaire. L'autre fragment, appelé C83, reste attaché à la membrane. Ultérieurement, la γ-sécrétase coupe ce fragment produisant un autre

fragment qui est libéré à l'intérieur de la cellule, où il régule la neprilysine, une metalloenzyme qui participe à la dégradation de l'Aβ (Grimm *et al.*, 2013).

Le chemin amyloïdogénique (**Figure 5**), par contre, donne lieu à l'apparition du peptide Aβ. Dans ce processus, l'enzyme β-sécrétase clive la protéine APP au niveau du domaine extracellulaire formant la partie N-terminal du peptide Aβ. Un autre clivage par la γ-sécrétase donne lieu finalement aux différentes espèces du peptide Aβ.

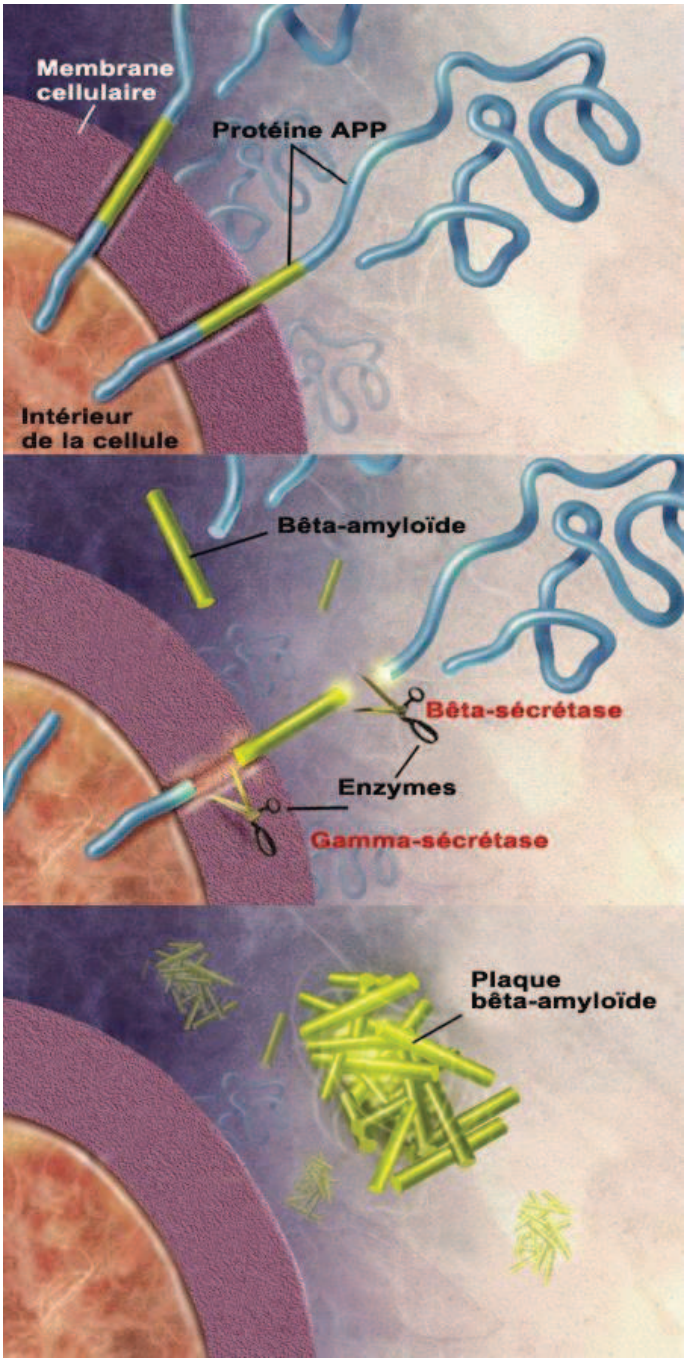


Figure 5 : Représentation de la formation et de l'agrégation du peptide Aβ à partir du clivage amyloïdogénique de la protéine APP par les enzymes β sécrétase et γ-sécrétase. Selon ce schéma, l'agrégation du peptide Aβ monomérique forme les plaques amyloïdes. Réproduit avec la permission du National Institute of Health.

1.5 L'hypothèse de la cascade amyloïde

Changée et adaptée selon les nouvelles avancées scientifiques, cette hypothèse propose que l'augmentation de la concentration des différents peptides amyloïdes soit à l'origine de la maladie d'Alzheimer (Selkoe, 1991 ; Hardy et Higgins, 1992). Cette augmentation peut s'effectuer soit *via* une augmentation de sa production, soit *via* une diminution de son élimination, et a comme conséquence une cascade de processus qui suscitent la mort cellulaire par une variété de mécanismes directs et indirects. La neurotoxicité progresse au cours des années jusqu'à l'apparition de la démence (Pimplikar, 2009).

Aujourd'hui, le rôle des plaques amyloïdes dans l'étiologie de la maladie est examiné d'un point de vue très critique, notamment après l'échec de deux candidats-médicaments pour le traitement de la maladie dans des essais cliniques de phase III : le solanezumab et le bapineuzumab. En effet, malgré leur capacité à éliminer les plaques amyloïdes du cerveau, ces deux candidats-médicaments se sont avérés impuissants à arrêter le déclin cognitif (Doody *et al.*, 2014 ; Salloway *et al.*, 2014).

L'étiologie de la maladie d'Alzheimer est loin d'être claire (Herrup, 2010 ; McGeer et McGeer, 2013 ; Drachman, 2014). La possibilité de développer la maladie augmente avec des changements normaux associés au vieillissement, comme des problèmes vasculaires (Attems et Jellinger, 2014 ; Hohman *et al.*, 2015), ou des processus neuroinflammatoires avec l'activation de la microglie (Itagaki *et al.*, 1989 ; McGeer et McGeer, 2013 ; Gilbert *et al.*, 2014 ; Lopategui Cabezas *et al.*, 2014 ; López-González *et al.*, 2015).

L'interconnexion étroite entre les différentes dysfonctions est un obstacle à l'attribution de la cause originale de la maladie. Aujourd'hui, l'accumulation du peptide Aβ n'est plus considérée comme la seule cause directe de la maladie. Par contre, elle doit être considérée comme un événement clé, qui est liée à une cascade complexe et ramifiée de plusieurs déséquilibres de la structure cérébrale qui favorisent

la destruction neuronale (Hardy, 2002 ; LaFerla et Oddo, 2005 ; Pimplikar, 2009 ; Jack *et al.*, 2013 ; McGeer et McGeer, 2013).

Parmi les différents mécanismes de neurotoxicité du peptide Aβ proposés on trouve :

i) L'augmentation du stress oxydatif, avec l'induction de la formation d'espèces oxygénées activées et du peroxyde d'hydrogène, et l'activation et la modulation de l'activité redox de cations métalliques tels que Cu^{2+} et Fe^{2+} (Rauk, 2009 ; Miller *et al.*, 2012 ; Kaminsky *et al.*, 2015). Le peptide Aβ montre un grand nombre d'effets nocifs sur la mitochondrie et par conséquent sur la synthèse d'ATP et l'activité de plusieurs enzymes mitochondriales (Kaminsky *et al.*, 2015).

ii) L'induction de l'hyperphosphorilation de la protéine tau, entrainant son incapacité à se lier aux microtubules et la formation de dégénérescences neurofibrillaires (Hurtado *et al.*, 2010 ; Bloom, 2014). La phosphorylation de la protéine tau permet aux neurones de réguler son interaction avec les microtubules. Son hyperphosphorylation diminue son affinité pour les microtubules, produisant une perturbation du cytosquelette, processus lié à la mort neuronale par apoptose. De plus, la protéine tau hyperphosphorilée renforce rétroactivement la production du peptide Aβ (LaFerla et Oddo, 2005 ; Bloom, 2014).

iii) L'induction du dysfonctionnement des synapses, peut être due à l'accumulation de formes solubles du peptide Aβ à l'intérieur des neurones (LaFerla et Oddo, 2005 ; Haupt *et al.*, 2012).

iv) L'insertion du peptide Aβ dans les membranes cellulaires, avec la formation de canaux ioniques permettant le passage d'ions comme Ca^{2+}, entraîne la dérégulation de son homéostasie (Arispe *et al.*, 1993, 1994 ; Garwood *et al.*, 2013 ; Matsuzaki, 2014).

1.6 La barrière hémato-encéphalique

Pour traiter les maladies neurodégénératives avec des médicaments, ou pour utiliser des agents d'imagerie pour le diagnostic de ces maladies, une molécule doit entrer dans le cerveau afin de pouvoir interagir directement avec les éléments neuropathologiques. Cependant, la barrière hémato-encéphalique (BHE) restreint considérablement l'entrée de la grande majorité des molécules thérapeutiques commerciales (Hawkins et Davis, 2005 ; Pardridge, 2007 ; Davis *et al.*, 2014).

L'environnement électrochimique des neurones doit être régulé et stable. La BHE protège l'homéostasie ionique cérébrale, et dans le même temps protège le cerveau des substances toxiques et indésirables. La BHE joue ainsi le rôle de barrière multiple (Abbott, 2013). On peut tout d'abord parler d'une barrière physique, puisque les jonctions serrées interdisent la possibilité d'un transport paracellulaire. Par ailleurs, la présence de transporteurs spécifiques pour de petites molécules et de systèmes de transcytosis pour des peptides et protéines permet la régulation de l'entrée et de l'efflux, créant ainsi une barrière de transport. De plus, plusieurs enzymes à l'intérieur et à l'extérieur des cellules peuvent métaboliser des produits toxiques, formant ainsi une barrière enzymatique. Dernièrement, il a été montré que la BHE contrôlait le trafic de leucocytes vers le cerveau, participant ainsi à une barrière immunologique. En résumé, la BHE est une barrière qui contrôle le trafic moléculaire, ionique et protéique, protège le cerveau des toxiques, et maintient une homéostasie dont le cerveau a besoin pour fonctionner de façon correcte.

Ainsi, il existe une interaction claire entre le peptide Aβ et la BHE (Burgmans *et al.*, 2013). Le disfonctionnement de la BHE est liée à une augmentation de l'accumulation du peptide Aβ dans le cerveau et une augmentation de la sensibilité des neurones à l'hypoxie et l'ischémie. A son tour, l'accumulation du peptide Aβ induit une augmentation de la perméabilité de la BHE (Popa-Wagner *et al.*, 2013 ; Montagne *et al.*, 2016).

La stabilité structurale et fonctionnelle de la BHE est maintenue grâce à l'existence de ce qu'on appelle l'unité neurovasculaire (UNV). Par cette dénomination on définit le système formé par des pericytes, des astrocytes, le microglia et les neurones, et leurs interactions avec la matrice extracellulaire et les cellules endothéliales (**Figure 6**). Les différents composants de l'UNV interagissent pour contribuer à la régulation du transport en direction du cerveau (Hawkins et Davis, 2005 ; Abbott *et al.*, 2006 ; Weiss *et al.*, 2009 ; Armulik *et al.*, 2010 ; Erickson et Banks, 2013).

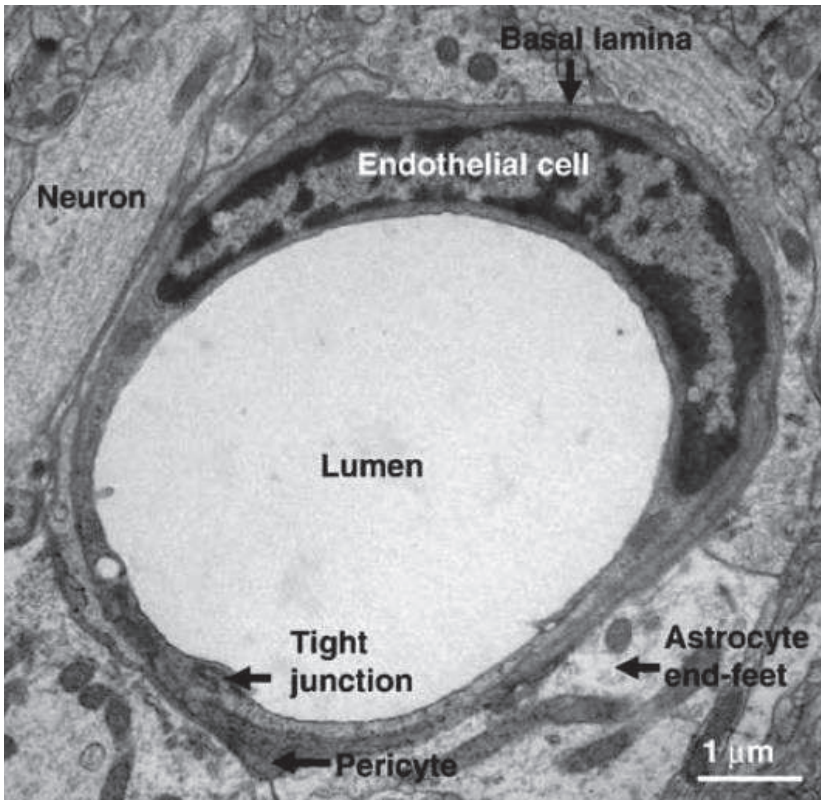


Figure 6 : L'unité neurovasculaire dans le cerveau de rat, obtenue par microscopie électronique en transmission. On observe une cellule endothéliale (*endothelial cell*) entourant le lumen (*lumen*) avec jonctions serrées (*tight junction*), qui interagit avec les pieds des astrocytes (*astrocyte end-feet*), les pericytes (*pericyte*), les neurones (*neuron*), et avec la lamelle basale (*basal lamina*). Adapté de (Weiss *et al.*, 2009) avec la permission de Elsevier.

Les capillaires du cerveau où l'on trouve la BHE sont très différents structurellement des capillaires du reste du corps (Hawkins et Davis, 2005). Parmi ces différences on trouve les jonctions serrées, formées par un réseau de protéines membranaires de cellules voisines liées par leurs domaines extracellulaires (Hawkins et Davis, 2005). Leurs protéines composantes principales sont l'occludine et la famille des claudines.

De plus, les cellules endothéliales qui entourent les vaisseaux sanguins présentent d'autres modifications structurelles par rapport aux cellules endothéliales périphériques, telles que l'augmentation du nombre de mitochondries, une pinocytose réduite, et une forte polarité membranaire, où l'expression des protéines de transport et des enzymes métaboliques est différente dans la membrane luminale par rapport à la membrane abluminale (Davis *et al.*, 2014).

Parmi les protéines participant à la régulation du transport dans la BHE humaine on peut mentionner la P-glycoprotéine et la BCRP comme étant les plus importantes (Dauchy *et al*., 2008; Shawahna *et al*., 2011; Abuznait et Kaddoumi, 2012; Davis *et al*., 2014). Ces deux transporteurs ABC sont capables d'effluer une grande quantité de molécules dans le milieu extracellulaire. Ainsi, elles ont une importance capitale dans la restriction de l'accès au cerveau d'agents exogènes, et doivent être prises en considération pendant les premières étapes de la recherche de nouveaux médicaments.

La BHE assure l'homéostasie cérébrale et constitue une protection du système nerveux central (SNC) vis à vis des composés exogènes. Cependant, cette protection affecte l'efficacité de nombreux médicaments et par ailleurs l'utilisation de produits destinés à l'imagerie cérébrale. Malgré son importance, beaucoup d'études laissent de côté les implications moléculaires du transport et de l'accumulation cérébrale des composés pouvant être utilisés pour la détection et le traitement des maladies neurodégénératives. Par conséquent, l'étude du transport à travers la BHE doit être une partie fondamentale de la conception des molécules destinées à agir au niveau du cerveau.

Il existe différentes méthodes pour l'administration d'un médicament dans le cerveau, mais seulement l'administration par voie vasculaire permettra une large diffusion de la molécule à travers l'ensemble du cerveau en raison de la grande surface de la BHE. Par ailleurs, d'autres méthodes d'administration de médicaments directement dans le cerveau et contournant la BHE sont risqués et souvent jugés peu efficaces.

Parmi les méthodes d'administration directe du médicament dans le cerveau on trouve essentiellement l'injection intracerebroventriculaire et l'implantation intracérébrale, qui ont toutes les deux des problèmes associés à la mauvaise diffusion dans le cerveau (Pardridge, 2007). L'administration transnasale a été aussi étudiée, mais son efficacité reste limitée. De plus, les mécanismes de transport au niveau de la BHE ne sont pas encore bien compris (Rowinska-Zyrek *et al.*, 2015). L'usage de nanoparticules comme vecteurs de transport a également été envisagé (Weiss *et al.*, 2008 ; Barbu *et al.*, 2009). Cependant, leur difficulté à traverser la membrane plasmique et leur toxicité rendent l'utilisation clinique des nanoparticules comme vecteurs de transport peu probable (Rowinska-Zyrek *et al.*, 2015).

Une autre option envisagée est la rupture temporaire de la BHE permettant l'entrée dans le cerveau de molécules incapables de la franchir, mais les effets secondaires de cette rupture peuvent être importants car elle serait susceptible de perturber l'homéostasie du cerveau. La perméabilisation de la BHE peut s'accomplir grâce à des modifications utilisant : (i) le mannitol hypertonique comme agent osmotique (Wang *et al.*, 2007), (ii) des substances vasoactives comme le bradykinin (Schürer *et al.*, 1989), ou (iii) des ultrasons avec microbulles (Choi *et al.*, 2011).

A cause des caractéristiques structurales de la BHE, et plus spécifiquement à cause des jonctions serrées, le transport transcellulaire est la seule voie de transport vers le cerveau. La diffusion passive à travers la membrane plasmique semble réservée aux molécules petites et lipophiles. Cependant, il existe aussi le transport médié par de transporteurs présents au niveau de la membrane plasmique. Ces protéines sont

impliquées dans le processus de diffusion facilitée dans le contexte d'un transport passif ou d'un transport actif contre le gradient électrochimique (Alberts *et al.*, 2007).

Certaines protéines membranaires sont essentielles pour le transport des molécules polaires, chargées ou de poids moléculaire élevé, qui sont incapables de traverser la membrane plasmique par diffusion passive. Le transport, d'une manière générale, est influencé par les propriétés de la molécule étudiée, en particulier la lipophilie, la masse moléculaire ou les propriétés acide-base. Dans le cas d'un transport médié par une protéine membranaire, où la reconnaissance protéine-substrat est nécessaire, il faut ajouter l'existence d'une structure de la molécule appropriée à cette reconnaissance. Il a été proposé que le peptide Aβ traverse la BHE par un transport médié par récepteur (Poduslo *et al.*, 1999). Dans la recherche d'agents de contraste visant le peptide Aβ, l'addition aux complexes de putrescine, une polyamine transportée par récepteur, favorise le passage en direction du cerveau (Poduslo et Curran, 1996 ; Kandimalla *et al.*, 2007).

En conclusion, le transport à travers la BHE est un système dynamique, où des processus d'entrée et de sortie coexistent. De plus, la dégradation métabolique subie par quelques composés qui traversent cette barrière doit être prise en considération. La vitesse nette considère tous ces processus dépendants des propriétés physicochimiques du composé. La vitesse nette d'entrée dans le cerveau est donc calculée comme la proportion entre la vitesse d'entrée par n'importe quel des mécanismes décrits, et la vitesse d'élimination, soit par efflux vers le sang ou par dégradation métabolique. De plus, la concentration de transporteurs d'efflux de la famille ABC est élevée dans la membrane luminale des cellules endothéliales (Löscher et Potschka, 2005a). Par conséquent, tout médicament substrat de l'un de ces transporteurs aura de probabilités faibles de traverser la BHE.

1.7 La famille des transporteurs ABC.

Chez l'humain, la famille des protéines ABC (*ATP binding cassette*) comprend 48 membres, classés en sept sous-familles (Chen *et al.*, 2016). Les transporteurs ABC sont impliqués dans le transport actif d'une grande variété de substrats à travers les membranes cellulaires de façon unidirectionnelle (Ween *et al.*, 2015). Ces protéines utilisent l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP pour transporter des substrats contre leur gradient de concentration (Vasiliou *et al.*, 2009).

La structure de toutes les protéines ABC est similaire et comporte une architecture modulaire, avec deux domaines d'union à l'ATP (*nucleotide binding domains*, NBDs) et deux groupes de domaines transmembranaires (*trans-membrane domains*, TMDs) (Chen *et al.*, 2016). Les NBDs sont structurellement similaires dans la plupart des membres de la famille. Ils interagissent avec l'ATP afin d'utiliser l'énergie résultant de son hydrolyse pour transporter différents substrats. Les TMDs sont organisés en α-hélices hydrophobes qui s'insèrent dans la membrane et qui interagissent avec le substrat. Par rapport aux NBDs, les TMDs ont une plus grande variabilité entre les différents membres de la famille ABC, ce qui influence la spécificité des substrats des différents transporteurs.

La variabilité et l'abondance des membres de la famille ABC fait d'elle un acteur important dans le fonctionnement normal du corps humain. Ainsi, des mauvais repliements ou des mutations dans ces protéines peuvent causer des maladies sévères (Rudashevskaya *et al.*, 2014). Par exemple, la fibrose kystique, une maladie génétique létale, est causée par des mutations du gène codant un transporteur ABC nommé CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), qui forme un canal permettant, notamment, le transport des ions chlorure (Martiniano *et al.*, 2014).

En raison de leur rôle de protéines d'efflux, certains membres de la famille ABC participent activement au phénomène de résistance multiple aux médicaments (*multi-drug resistance*, ou MDR). Ce phénomène se caractérise par l'apparition d'une

résistance à des médicaments de structures et de mécanismes d'action divers, comme conséquence d'un traitement chimiothérapeutique (Baguley, 2010).

L'activité d'efflux de plusieurs transporteurs ABC a un rôle important au niveau des barrières biochimiques du corps humain (Annaert *et al*., 2001). Elles jouent un rôle primordial au niveau de la BHE, mais elles sont aussi présentes dans d'autres barrières du corps humain comme la barrière intestinale et la barrière hémato-testiculaire (Marzolini *et al.*, 2004).

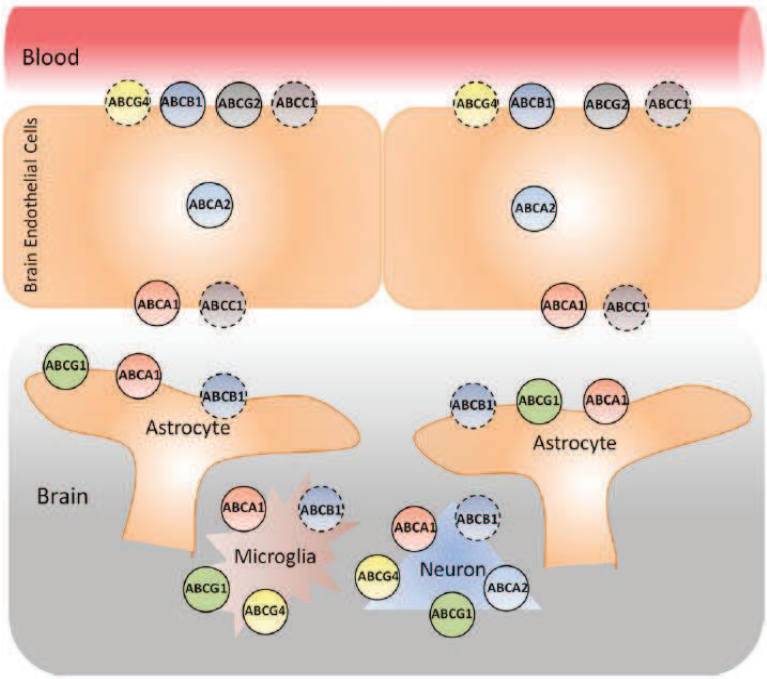


Figure 7 : Expression des transporteurs ABC dans l'UNV. La localisation de certaines protéines n'a pas été déterminée avec certitude (cercles pointillés). Les deux protéines principales dans le côté luminal des cellules endothéliales sont la P-gp (ABCB1) et la BCRP (ABCG2). Reproduit de (Abuznait et Kaddoumi, 2012) avec la permission de American Chemical Society.

Parmi les transporteurs ABC, la P-gp et la BCRP *(Breast cancer resistance protein)* sont les deux transporteurs les plus souvent exprimés au niveau de la BHE (**Figure 7**) (Dauchy *et al.*, 2008 ; Scherrmann, 2009 ; Shawahna *et al.*, 2011 ; Abuznait et Kaddoumi, 2012 ; Davis *et al.*, 2014; Miller, 2015). Ces protéines ont une importance capitale en ce qui concerne l'accès au cerveau d'agents exogènes, et doivent être prises en considération pendant les premières étapes de la recherche de nouveaux médicaments à but intracérébral.

1.8 La P-glycoprotéine

La P-glycoprotéine (P-gp ou MDR1) est un des transporteurs les plus étudiés de la famille ABC, et fut découverte lors des études visant à déterminer les causes de la MDR (Juliano et Ling, 1976). Il s'agit d'une protéine monomérique de 170 kDa (1280 acides aminés) synthétisée par le gène ABCB1 situé sur le chromosome 7 humain (Amin, 2013 ; Dei *et al.*, 2014). La P-gp est un transporteur unidirectionnel d'efflux situé principalement au niveau de la membrane plasmique (Fu et Arias, 2012).

La P-gp est caractérisée par une faible spécificité de substrats. Elle transporte une grande variété de molécules de poids moléculaires très divers, compris entre 0,25 et 1,20 kD (Amin, 2013). Ses substrats sont souvent des molécules chargées positivement et contenant des domaines hydrophobes (Gleeson, 2008 ; Baguley, 2010).

Parmi les substrats de la P-gp on peut citer des médicaments anticancéreux (daunorubicine, doxorubicine, vinblastine), des antihistaminiques (cetrizine), des antipsychotiques (rispéridone), des antirétroviraux (indinavir, saquinavir), et des antiarythmiques (quinidine, verapamil) (Marquez et Van Bambeke, 2011). En ce qui concerne le transport du peptide Aβ, il existe une controverse sur le rôle de la P-gp (Bello et Salerno, 2015).

La P-gp est exprimée dans de nombreux organes du corps humain, tels que le foie, l'intestin, les reins, les testicules, les ovaires, le placenta, et la BHE (**Figure 8**) (Marzolini *et al.*, 2004). L'activité d'efflux de la P-gp permet de réduire l'absorption de toxines au niveau de l'intestin et favorise l'élimination de médicaments par le foie et les reins. Dans les barrières présentes au niveau des testicules ou du placenta, ou dans la BHE, la P-gp réduit l'exposition de tissus sensibles à des composés potentiellement toxiques (Marzolini *et al.*, 2004).

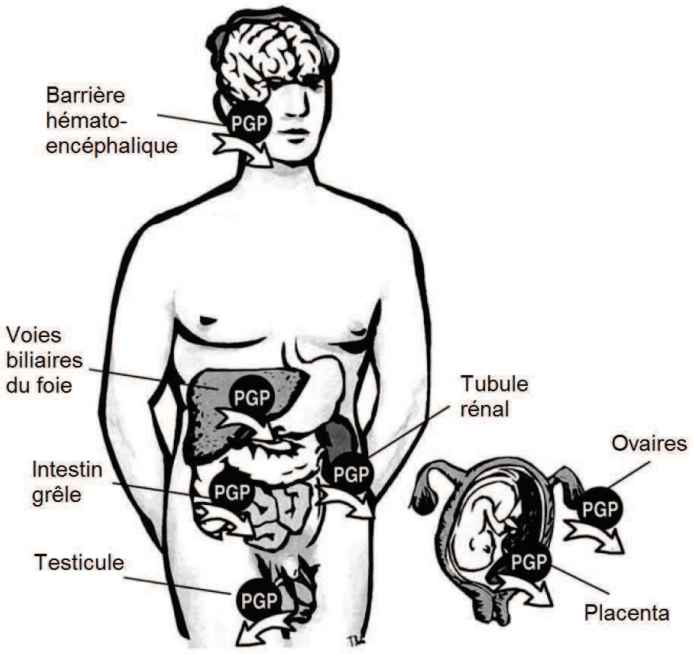


Figure 8 : Expression de la P-gp dans le corps humain. Reproduit de (Marzolini *et al.*, 2004) avec la permission de Wiley.

La structure de la P-gp de la souris (Aller *et al.*, 2009) et du nématode *C. elegans* (Jin *et al.*, 2012) a été obtenue par cristallographie. Cependant, la structure de la P-gp humaine n'a pas été déterminée avec précision. La P-gp est composée de douze TMDs, structurés en deux groupes de six α-hélices hydrophobiques, et deux NBDs situés dans le cytoplasme (Aller *et al.*, 2009). Le site de liaison pour les substrats de la P-gp se trouve entre les deux TMDs (Aller *et al.*, 2009 ; Sharom, 2014). Dans la surface de cette grande cavité (~ 6000 $Å^3$) on trouve des résidus aromatiques et hydrophobes qui

fixent les substrats grâce à des interactions hydrophobiques et de Van der Waals, mais aussi plusieurs résidus polaires qui utilisent des interactions électrostatiques avec les substrats (Aller *et al*., 2009).

Il a été démontré que deux molécules du même composé peuvent interagir simultanément avec différents résidus dans le site actif de la P-gp (Aller *et al*., 2009). Ceci suggère la présence de différents sous-sites à l'intérieur du site actif de la P-gp, qui seraient utilisés préférentiellement, mais non exclusivement, par les substrats en fonction de leur nature (Parveen *et al*., 2011 ; Chufan *et al*., 2013).

Trois modèles ont été proposés pour expliquer le mécanisme d'efflux de la P-gp (Aller *et al.*, 2009 ; Eckford et Sharom, 2009 ; Colabufo *et al.*, 2010).

- Dans le modèle du pore, les substrats sont identifiés par la P-gp dans le cytosol et transportés vers le milieu extracellulaire.
- Dans le modèle de la flippase, le transporteur prend en charge les substrats du côté interne de la bicouche lipidique et les transporte grâce à un changement de conformation vers la partie extérieure de la membrane, et non directement dans le milieu aqueux extracellulaire.
- Dans le modèle de l'aspirateur, les molécules entrent en interaction avec la P-gp au niveau de la membrane, et sont transportés vers la phase aqueuse extracellulaire.

Ces deux derniers modèles ne sont pas mutuellement exclusifs, et un modèle combiné peut être proposé (**Figure 9**), dans lequel un changement de conformation provoqué par la liaison de l'ATP libère le substrat, soit dans le milieu aqueux extracellulaire, soit dans la partie extérieure de la membrane, en fonction de son hydrophobicité (Aller *et al.*, 2009 ; O'Brien, 2013).

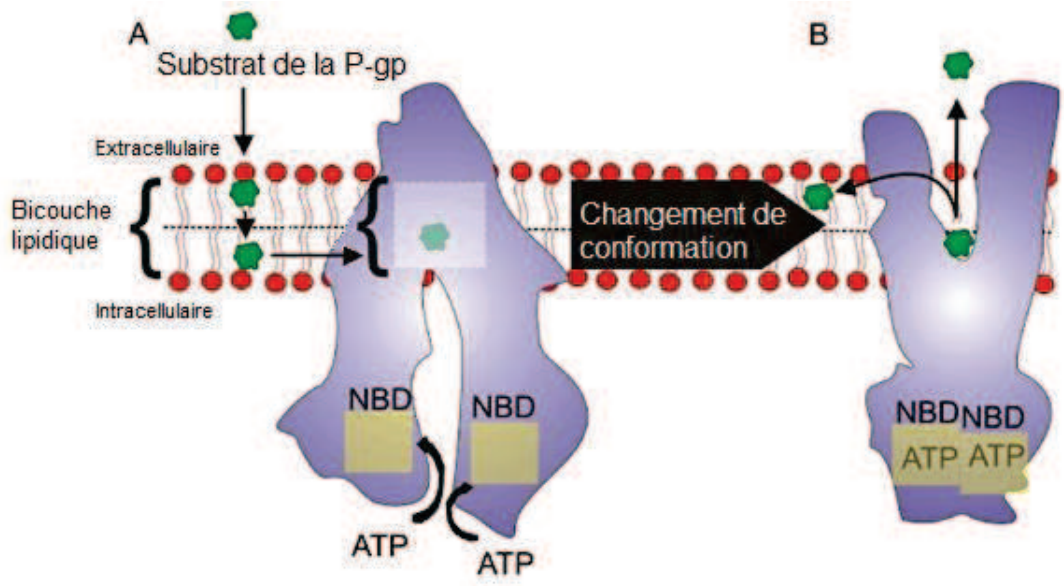


Figure 9 : Modèle combiné proposé pour le transport des substrats de la P-gp. La reconnaissance du substrat qui se trouve dans la membrane cellulaire (A) est suivie par un changement de conformation après liaison de l'ATP (B), et le substrat est libéré dans le milieu aqueux extracellulaire (modèle de l'aspirateur) ou du côté externe de la bicouche lipidique (modèle de la flippase) (O'Brien, 2013).

1.9 La BHE et la P-gp dans la maladie d'Alzheimer

L'importance de la BHE dans le maintien de l'homéostasie cérébrale suggère l'étude de cette barrière dans des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. L'influence de la dysfonction de la BHE dans cette maladie est un sujet controversé, car quelques études montrent une perméabilisation de la BHE chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, mais des autres ne trouvent pas d'altération (Gosselet *et al.*, 2013). Cette contradiction pourrait être liée à des différences dans les techniques utilisées ou le stade de la maladie. La neurodégénérescence typique des stades avancés pourrait amener à la dysfonction de la BHE comme une conséquence de la pathologie.

La P-gp pourrait jouer un rôle dans le transport du peptide amyloïde dès le cerveau à travers la BHE, si bien plus amples recherches sont nécessaires sur ce sujet (Bello et Salerno, 2015). L'efflux du peptide Aβ monomérique vers le sang réduit son concentration intracérébrale, ce qui protègerait le cerveau contre la production de formes agrégés. Si cet efflux est influencé par la P-gp, une réduction de la fonction de cette protéine pourrait favoriser l'agrégation du peptide Aβ.

Une étude comparant des patients atteints de la maladie d'Alzheimer avec des patients sains du même âge a montré une augmentation de l'accumulation intracérébrale du (R)-[^{11}C]vérapamil sur les patients malades (Assema *et al*., 2012). Le vérapamil étant un substrat de la P-gp, ces résultats suggèrent une réduction globale de la fonction de cette protéine de transport au niveau de la BHE chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

1.10 Le diagnostic de la maladie d'Alzheimer.

Les critères utilisés pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer sont révisés régulièrement dans le but de prendre en compte les nouvelles découvertes. Ainsi, les critères proposés aux Etats-Unis en 1984 par le *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke* et l'*Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (McKhann *et al.*, 1984) ont été révisés plusieurs fois (Lopez *et al.*, 2011), et le seront certainement encore dans le futur.

Quatre groupes de travail réunis par le *National Institute on Aging* et l'*Alzheimer's Association* aux États-Unis ont rédigé une proposition concernant les critères à retenir pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer (Jack *et al.*, 2011). Ces groupes de travail ont développé quatre documents qui considèrent cette maladie comme un continuum et reconnaissent l'existence d'un stade préclinique présymptomatique de la maladie.

Selon ces travaux, la maladie d'Alzheimer est divisée en trois stades successifs (**Figure 10**) : (i) un stade préclinique où les biomarqueurs de la maladie, dont on parlera plus tard, deviennent anormaux, mais dans lequel aucun déclin cognitif n'est appréciable ; (ii) un stade de trouble cognitif léger (TCL) avec des problèmes de mémoire, de langage, de raisonnement ou de jugement plus sérieux que ceux liées purement au vieillissement normal, mais qui ne nuisent pas à la vie quotidienne ou à l'autonomie de la personne ; (iii) un stade final de démence, où les problèmes cognitifs deviennent tellement graves que la personne perd son autonomie.

Des critères diagnostiques ont été proposés pour le stade finale de la démence (McKhann *et al.*, 2011) et le stade de TCL (Albert *et al.*, 2011). En ce qui concerne le stade préclinique, il est consideré que l'utilisation de biomarqueurs n'est pas suffisante pour diagnostiquer la maladie d'Alzheimer avant l'apparition du déclin cognitif, même s'il est possible de détecter leur anormalité (Sperling *et al.*, 2011).

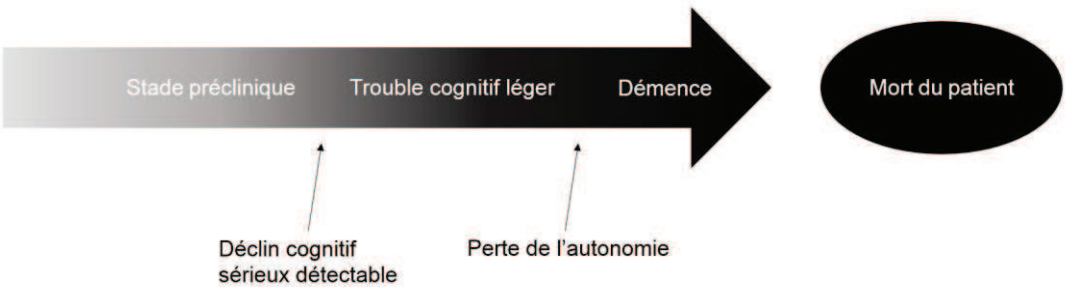


Figure 10 : Représentation schématique des trois stades de la maladie d'Alzheimer (Jack *et al.*, 2011).

Cependant, l'utilisation de biomarqueurs a le potentiel de permettre un diagnostic précoce, essentiel pour pouvoir proposer un traitement qui empêche la progression de la maladie jusqu'au stade de démence. Les traitements pour réduire ou arrêter la progression du déclin cognitif seront possiblement plus efficaces dans les premiers stades de la maladie (Alzheimer's Association, 2015 ; Dubois *et al.*, 2016).

En termes généraux, le diagnostic de la démence ou du TCL est la première étape dans le diagnostic de la maladie d'Alzheimer. Le déclin cognitif est détecté soit avec un examen du patient ou un test neuropsychologique, soit à travers le témoignage du patient ou d'un proche. Il est évalué en termes des domaines affectés, de la vitesse du déclin mental et de l'absence d'autres maladies neurodégénératives telles que la démence vasculaire ou la démence à corps de Lewy, pour proposer un diagnostic probable ou possible de la maladie. Ces directives ont été incluses dans la dernière édition du DSM-5, le « Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux de l'Association Américaine de Psychiatrie » (American Psychiatric Association, 2013), si bien qu'il est traditionnellement considéré que le diagnostic définitif de la maladie d'Alzheimer ne peut être effectué que *post-mortem*, après l'examen détaillé du cerveau.

En absence d'un traitement efficace, plusieurs problèmes éthiques, sociaux et économiques se présentent (George *et al.*, 2013). Est-il éthiquement acceptable de communiquer à une personne saine l'existence irrémédiable d'une maladie grave dans son futur ? D'autres personnes tels que la famille proche, assurances, etc., devraient-ils avoir accès à cette information ? Cette stigmatisation du futur malade est spécialement dangereuse dans le cas d'un faux positif ou un faux négatif. Aux Etats Unis, le pourcentage de patients à qui le diagnostic de leur maladie est communiqué est d'environ 33 %. Ce chiffre est assez différent par comparaison à l'annonce d'un cancer aux patients, qui oscille autour du 95 % (Alzheimer's Association, 2015). Le consensus officiel est que le patient et ses proches doivent connaitre la vérité, et que le diagnostic de la maladie doit être communiqué, avec un langage clair et honnête, aux intéressés (Alzheimer's Association, 2015).

Chapitre 2.

Imagerie médicale et maladie d'Alzheimer

« Everyone builds on other men's failures.
There is nothing really original in science.
What each man contributes to the sum of knowledge is what counts. »
Tout le monde construit sur les échecs des autres.
Il n'y a rien de véritablement original en science.
Ce qui compte, c'est ce que chacun apporte à la somme des connaissances.

Daniel Keyes, Flowers for Algernon

2.1 Les biomarqueurs dans la maladie d'Alzheimer

Un biomarqueur est définit comme une caractéristique biologique mesurable liée à un processus normal ou non, qui permet, dans le domaine de la santé, le diagnostic d'une maladie et le suivi d'un traitement médical. Par exemple, un faible taux de fer dans le sang est un biomarqueur de l'anémie, tandis qu'une glycémie élevée est un biomarqueur du diabète sucré.

Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer deux processus neuropathologiques coexistent : les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires, qui conduisent à la neurodégénérescence (Dubois *et al.*, 2016). Les biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer utilisés en clinique peuvent être mesurés dans le liquide cérébro-spinal et par l'imagerie médicale. Ils permettent d'établir la présence de ces deux processus neuropathologiques et la présence de neurodégéneration (Jack *et al.*, 2010 ; Babić *et al.*, 2014 ; Caroli *et al.*, 2015 ; Jack *et al*., 2016) et peuvent se diviser selon le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Biomarqueurs utilisés dans le contexte clinique pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer (Alzheimer's Association, 2015).

	Imagerie médicale	**Liquide cérébro-spinal**
Plaques amyloïdes	Détection d'Aβ par TEP	Concentration d'Aβ
Protéine tau	-	Concentration de tau
Neurodégéneration	Hypométabolisme Atrophie de l'hippocampe	-

Les biomarqueurs génétiques sont de bons outils pour la prédiction de la maladie d'Alzheimer familiale précoce mais leur utilisation est limitée dans le cas de la forme sporadique tardive (Babić *et al.*, 2014). Le facteur de risque génétique le plus important est le gène de l'apolipoprotéine E (APOE). Des différents allèles du gène de l'APOE augmentent ou diminuent le risque de développer la maladie, principalement en cas d'homozygotie. Les porteurs homozygotes de l'allèle E4 ont un risque 15 fois supérieur aux porteurs homozygotes de l'allèle E3, qui est le plus fréquent (Bettens *et al.*, 2013 ; Yu *et al.*, 2014). Cependant, l'APOE E4 n'est ni nécessaire ni suffisant pour le développement de la maladie d'Alzheimer (Bettens *et al.*, 2013).

La simplicité de l'extraction sanguine a motivé la recherche de biomarqueurs dans le plasma sanguin, notamment au niveau du peptide Aβ, mais aussi pour des biomarqueurs d'inflammation, stress oxydatif, ou problèmes vasculaires. Cependant, les études publiées sont contradictoires et aucune liaison claire n'a été établie entre la concentration du peptide Aβ dans le plasma sanguin et la maladie d'Alzheimer, probablement parce que le peptide Aβ dans le plasma sanguin ne provient pas uniquement du cerveau mais aussi d'autres tissus (Irizarry, 2004 ; Blennow *et al.*, 2012).

Aujourd'hui, il est accepté que les biomarqueurs associés à l'accumulation du peptide Aβ et protéine tau deviennent anormaux dans un premier temps, y compris l'observation de plaques amyloïdes avec imagerie médicale du cerveau et la modification des niveaux du peptide Aβ (1-42) et protéine tau dans le liquide cérébro-spinal. Puis on peut observer des biomarqueurs de neurodégénérescence tels que l'hypométabolisme ou l'atrophie de l'hippocampe. Finalement, le déclin cognitif se manifeste cliniquement (Lo *et al.*, 2011 ; Sperling *et al.*, 2011 ; Chételat *et al.*, 2013 ; Jack *et al.*, 2013). Les premiers indices et le stade de démence sont séparés par plusieurs années, et la vitesse d'évolution de la maladie est très variable selon l'individu (Sperling *et al.*, 2011 ; Jack *et al.*, 2013).

L'utilisation exclusive de biomarqueurs ne permet pas aujourd'hui de faire un diagnostic clinique de la maladie d'Alzheimer. Cependant, la validation de nouveaux biomarqueurs et leur inclusion dans le diagnostic a le potentiel de confirmer la présence de la maladie chez un patient. Différents biomarqueurs font partie des critères de diagnostic pour la maladie, et ils sont utilisés dans une grande partie des essais cliniques (McKhann *et al.*, 2011 ; Palmqvist *et al.*, 2015).

2.2 Les biomarqueurs dans le liquide cérébro-spinal

L'extraction du liquide cérébro-spinal a l'avantage de permettre la mesure simultanée de biomarqueurs d'autres maladies permettant d'améliorer le diagnostic différentiel. Par ailleurs ceci ne nécessite pas d'appareil d'imagerie spécialisé (Zetterberg et Schott, 2016). Les niveaux de peptide Aβ (sous les formes Aβ (1-42) et Aβ (1-40)) et de protéine tau (totale et phosphorylée) dans le liquide cérébro-spinal donnent une quantification de la présence dans le cerveau des plaques amyloïdes et de la dégénérescence neuronale, respectivement (Anoop *et al.*, 2010 ; Babić *et al.*, 2014). Si bien l'obtention des échantillons, par ponction lombaire, est relativement invasive pour le patient, le liquide cérébro-spinal apporte une précision supérieure à des autres fluides du corps humain tels que le sang ou l'urine, compte tenu du contact direct avec le tissu cérébral.

Les niveaux du peptide Aβ (1-42) dans le liquide cérébro-spinal diminuent d'environ 50 % chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Ce processus est lié à l'agrégation du monomère, sous forme de plaques amyloïdes au niveau du cerveau, qui empêche sa diffusion du cerveau vers le liquide cérébro-spinal (Andreasen et Zetterberg, 2008). La concentration de la forme Aβ (1-40) dans le liquide cérébro-spinal montre peu de variations entre les patients atteints de la maladie d'Alzheimer et les individus sains (Hansson *et al.*, 2007 ; Masters et Selkoe, 2012 ; Ritchie *et al.*, 2014).

La protéine tau peut être libérée vers le liquide cérébro-spinal après un processus de rupture neuronale (Blennow *et al.*, 2012). Les niveaux de protéine tau totale et de protéine tau phosphorylée sont plus élevés chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer que chez les patients du groupe témoin. Cependant, ce biomarqueur ne permet pas de discriminer la maladie d'Alzheimer des autres formes de démence dans lesquelles la protéine tau est aussi présente, comme la démence vasculaire ou la démence frontotemporale (Anoop *et al.*, 2010).

2.3 Les techniques d'imagerie pour la détection de la maladie d'Alzheimer.

Plusieurs techniques d'imagerie médicale ont été utilisées dans le cadre des recherches liées à la maladie d'Alzheimer (Ewers *et al.*, 2011). L'utilisation de ces techniques a mis en lumière des processus liés à l'évolution de la maladie. Dans ce contexte, les techniques d'imagerie les plus souvent utilisées (**Tableau 2**) sont : (i) la tomographie d'émission, soit comme tomographie d'émission de positrons (TEP), soit comme tomographie d'émission monophotonique (TEMP) ; (ii) l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

Tableau 2 : Résumé des caractéristiques des techniques d'imagerie TEP, TEMP, et IRM. Modifié d'après (Prodi *et al.*, 2015).

	Source de l'énergie utilisée	**Agent de contraste utilisé**	**Sensibilité (mol/L)**	**Résolution en clinique (mm)**	**Temps d'analyse**
TEP	Rayon gamma issu de l'annihilation d'un positron	Radionucléides	10^{-10}-10^{-12}	6-10	min
TEMP	Rayon gamma issu du radionucléide	Radionucléides	10^{-10}-10^{-12}	7-15	min
IRM	Ondes radio	Chélates de Gd	~10^{-6} pour l'Aβ (Aime *et al.*, 2002)	0,5-1,5	min – h

D'autres techniques d'imagerie utilisées dans la contexte de la maladie d'Alzheimer incluent : la microscopie multiphotonique, une méthode optique à très grande résolution mais seulement utilisable à environ 1 mm de profondeur de la surface du cerveau (Dong *et al.*, 2010 ; Kawakami *et al.*, 2013) ou la spectroscopie proche infrarouge (Obrig, 2014). Cependant, ces techniques ont des limitations techniques qui empêchent aujourd'hui leur utilisation clinique pour le diagnostic de la maladie, notamment l'impossibilité d'arriver à enregistrer des images fiables de régions profondes du cerveau. Des approches d'imagerie multimodale ont été aussi proposées, avec l'utilisation combinée et simultanée de diverses techniques d'imagerie (Price, 2012).

Dans la littérature récente on trouve le développement de quelques radiotraceurs visant la protéine tau dans le cerveau et utilisables en TEP (Xia *et al.*, 2013 ; Okamura *et al.*, 2014). Lors de premières études chez l'humain, il a été trouvé que l'accumulation de ces radiotraceurs dans le cerveau est corrélée avec l'atrophie cérébrale et avec la présence des plaques amyloïdes (Sperling *et al*., 2014 ; Johnson *et al.*, 2016 ; Villemagne *et al*., 2016). Cependant, plus d'études *in vivo* sont nécessaires pour la validation clinique de ces résultats. En comparaison, l'imagerie médicale des plaques amyloïdes joue aujourd'hui un rôle majeur en tant qu'outil pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer. Pour cette raison nous avons préféré nous centrer sur l'imagerie du peptide Aβ.

Lors de l'étude par imagerie médicale, 96 % des patients présentant un diagnostic clinique de démence lié à la maladie d'Alzheimer montrent des plaques amyloïdes en quantité similaire à celle obtenue lors de l'examen *post mortem* du cerveau (Klunk, 2011).

Cependant, dans le groupe de patients qui ne montrent pas de déclin cognitif, on détecte des plaques amyloïdes chez 20 à 40 % des patients (Thal *et al.*, 2002 ; Klunk, 2011 ; Sperling *et al.*, 2011 ; Chételat *et al.*, 2013). Cette spécificité relativement faible peut être liée à la présence des plaques amyloïdes dans les premières étapes de la

maladie (Jack *et al.*, 2011). Il a été suggéré que ce groupe de patients présentaient la maladie d'Alzheimer dans son stade préclinique, et que ces patients pourraient souffrir de démence dans le futur (Small *et al.*, 2007 ; Jack *et al.*, 2013). L'absence de plaques dans un scan établit l'inexistence de la maladie d'Alzheimer.

La présence de plaques amyloïdes dans le cerveau augmente la probabilité de développer des symptômes de démence. Une étude de Villemagne et collaborateurs a montré que deux tiers des patients présentant un déclin cognitif léger ayant des plaques amyloïdes progressent vers de stades de démence après 20 mois (Villemagne *et al.,* 2011). Ces exemples montrent comment l'imagerie du peptide Aβ permet d'augmenter la précision d'un diagnostic clinique de l'affection (Klunk, 2011 ; Schipke *et al.*, 2012).

La détection des oligomères du peptide Aβ pourrait être intéressante compte tenu de sa neurotoxicité et de son importance dans le développement de la maladie (Lesné *et al.*, 2013). Malgré la jeunesse de cette voie de recherche, des études biochimiques ont déjà conduit à la découverte d'anticorps capables de détecter des oligomères du peptide Aβ. Jusqu'à présent, son utilisation clinique afin de marquer les peptides amyloïdes dans le cerveau est impossible du fait que les anticorps proposés ne traversent pas la BHE et ne peuvent donc pas accéder au cerveau (Lambert *et al.*, 2007 ; Viola *et al.*, 2015).

En résumé, la détection des plaques amyloïdes par des techniques d'imagerie médicale est un outil de diagnostic reconnu. Ainsi, l'imagerie médicale permet de renforcer la validité du diagnostic de la maladie d'Alzheimer, lorsqu'il est accompagné des preuves d'une détérioration cognitive. Elle permet, notamment, de distinguer la maladie d'Alzheimer d'autres démences non-amyloïdes dans lesquelles les plaques ne sont pas présentes, comme par exemple la démence vasculaire. Le diagnostic précis du type de démence permet d'optimiser et de personnaliser le traitement à effectuer.

2.4 La tomographie d'émission

2.4.1 La tomographie par émission de positrons.

La TEP est basée sur la localisation dans le corps d'un radiotraceur contenant un isotope radioactif émetteur de positrons. Les positrons émis peuvent se déplacer de quelques millimètres avant d'accomplir un processus radioactif d'annihilation donnant naissance à deux photons gamma de 511 keV éjectés suivant deux trajectoires séparées de 180°. La détection simultanée de ces photons permet, avec un traitement mathématique, la localisation du lieu d'émission et donc la localisation du radiotraceur dans le corps.

Le ^{18}F-fluorodeoxyglucose (FDG) est un analogue du glucose utilisé en TEP pour mesurer le métabolisme du glucose dans un tissu. Dans le cerveau, l'évaluation du métabolisme cérébrale du glucose permet d'estimer l'activité synaptique et d'identifier la présence et la localisation de dysfonctionnements neuronales dans le cadre de la maladie d'Alzheimer (Drzezga *et al.*, 2005 ; Karow *et al.*, 2010 ; Frisoni *et al.*, 2013 ; Bailly *et al.*, 2015).

La détection du peptide Aβ par TEP est basée sur la détection spécifique des plaques amyloïdes grâce à leur union réversible à un radiotraceur, un *marqueur* des plaques amyloïdes (Klunk *et al.*, 2004 ; Yang et Cui, 2014 ; Oukoloff *et al*., 2015). Les plaques amyloïdes forment des structures secondaires en forme de feuilles-bêta grâce aux liaisons hydrogène, les interactions électrostatiques, et l'empilement π-π d'éléments aromatiques.

Des molécules aromatiques planes peuvent se placer spécifiquement dans les régions hydrophobes existantes dans les plaques grâce à l'empilement π-π et aux interactions hydrophobes. La présence d'une large structure plane de groupes aromatiques conjugués et d'atomes donneurs d'électrons dans la molécule améliore l'affinité pour les plaques amyloïdes (Rauk, 2009 ; Hickey et Donnelly, 2012 ; Hickey

et al., 2013 ; Yang et Cui, 2014). Ce fait est utilisé pour la détection des plaques amyloïdes à l'aide de radioisotopes visibles avec TEP (**Figure 11**).

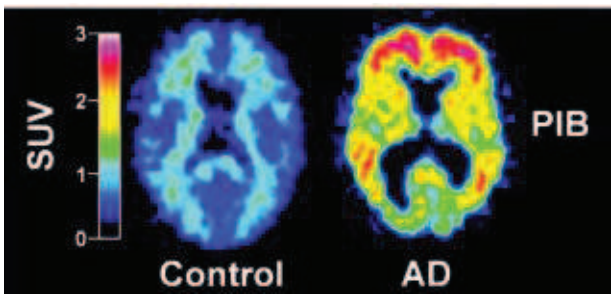


Figure 11 : Comparaison du scan de TEP d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer avec un individu sain témoin (SUV, valeur d'incorporation du composé Pittsburgh B (PiB) standardisée ; AD, maladie d'Alzheimer). Reproduit de (Klunk *et al.*, 2004) avec la permission de Wiley.

Différents radiotraceurs, capables de détecter le peptide Aβ et utilisables en TEP, ont été développés à partir des colorants histologiques classiques comme le Rouge Congo, les thioflavines S ou T, des benzoxazols et des stilbènes (LeVine, 1993 ; Klunk *et al.*, 1999, 2004 ; Oukoloff *et al*., 2015). Le plus reconnu est le composé Pittsburgh B (PiB) (Klunk *et al.*, 2004 ; Cohen *et al.*, 2012), un dérivé de la thioflavine T marqué radioactivement avec l'isotope ^{11}C permettant son usage en TEP. Après injection intraveineuse, le PiB traverse la BHE et se lie aux plaques amyloïdes dans le cerveau. Il permet ainsi une détection *in vivo* des plaques amyloïdes comparable à celle obtenue post mortem (Fodero-Tavoletti *et al.*, 2009 ; Klunk, 2011 ; Chételat *et al.*, 2013).

Un nombre important d'autres radiotraceurs marqués avec les isotopes ^{11}C et ^{18}F ont été développés après le PIB, comme le flutemetamol (Curtis *et al.*, 2015), le florbetapir (Wong *et al.*, 2010) ou le florbetaben (Schipke *et al.*, 2012) (**Figure 12**). En général, il y a une très bonne corrélation entre le PIB et les autres radiotraceurs pour la détection des plaques amyloïdes (Klunk et Mathis, 2008 ; Villemagne *et al.*, 2011 ; Mathis *et al.*, 2012 ; Vandenberghe *et al.*, 2013).

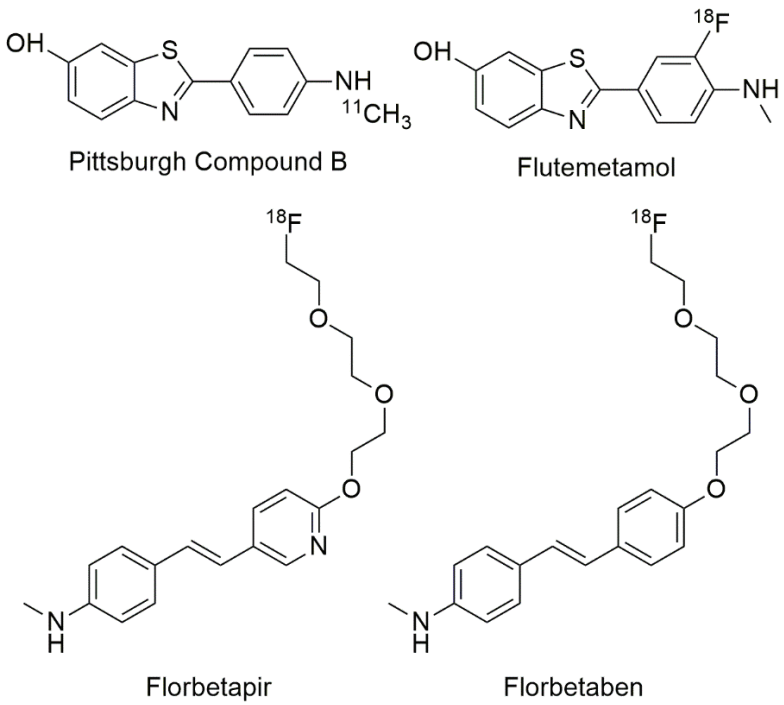


Figure 12 : Structures chimiques du PiB, du flutemetamol, du florbetapir et du florbetaben.

Les premiers radiotraceurs développés, comme le PiB, utilisaient comme isotope radioactif le ^{11}C (Klunk *et al.*, 2004). Cependant, la demi-vie de cet isotope est seulement de 20 minutes ce qui nécessite sa production dans un cyclotron à proximité du lieu de l'examen. D'autres radiotraceurs marqués au ^{18}F ont été développés (Zeng et Goodman, 2013). La demi-vie de cet isotope (110 min) augmente la disponibilité du radiotraceur, mais elle reste néanmoins faible. ^{18}F-florbetapir (Wong *et al.*, 2010) a été le premier radiotraceur approuvé par la *Food et Drug Administration* (FDA) et la *European Medicines Agency* (EMA) pour son utilisation clinique.

Le cuivre possède quatre isotopes capables d'émettre des positrons et donc, utilisables pour cette technique d'imagerie médicale : ^{60}Cu, ^{61}Cu, ^{62}Cu, et ^{64}Cu. De

plus, l'ion Cu^{2+} est capable de former des complexes stables avec une grande variété de ligands (Smith, 2004 ; Shokeen et Anderson, 2009 ; Niccoli Asabella *et al.*, 2014).

Les radionucléides ^{60}Cu et ^{62}Cu, ayant une demi-vie de 20 minutes, sont facilement produits avec un cyclotron ou, dans le cas de ^{62}Cu, à partir de ^{62}Zn. ^{61}Cu et ^{64}Cu ont une demi-vie de 3,4 heures et 12,7 heures respectivement, et ils peuvent être produits dans un cyclotron de basse énergie. L'isotope ^{64}Cu produit des positrons découplés de toute émission gamma interférente, ce qui affine la qualité des images et produit un meilleur rapport signal sur bruit (Smith, 2004 ; Hayne *et al.*, 2014).

Un seul ligand capable de complexer rapidement l'ion Cu^{2+} serait ainsi capable de produire toute une gamme de radiotraceurs avec des radioisotopes avec des demi-vies différentes (Garcia-Alloza et Bacskai, 2004 ; Hickey *et al.*, 2013 ; Hayne *et al.*, 2014). Lorsque des isotopes radioactifs particuliers sont utilisés, comme dans le cas de la TEP, l'utilisation de différents radioisotopes du cuivre permet l'ajustement de la demi-vie du radioisotope à l'expérience clinique.

Ainsi, la possibilité d'avoir des isotopes radioactifs avec une demi-vie allant de quelques minutes à plusieurs jours permet d'agir sur ce paramètre afin d'optimiser l'information médicale et la gestion de la production. De plus, on peut remarquer que l'incorporation, relativement « facile et simple », d'un métal dans un ligand accepteur spécifiquement conçu est une alternative à la synthèse de composés dans lesquels l'incorporation de ^{11}C ou de ^{18}F à la molécule s'effectue par liaison covalente.

Parmi les isotopes radioactifs du cuivre le plus utilisé en TEP est ^{64}Cu. L'incorporation dans les tumeurs du radiotraceur ^{64}Cu-atsm, biomarqueur de l'hypoxie tumorale, permet d'identifier les patients avec un pronostic de réaction positive aux traitement dans des cancers de poumon, rectum, ou cancer du col utérin (Lewis *et al.*, 2008 ; Paterson et Donnelly, 2011).

Des études d'imagerie ont utilisé ^{64}Cu complexé à tetraazamacrocycles comme le dota ou le teta conjugués avec octreotide, un marqueur des récepteurs de la somatostatine trouvés dans la membrane plasmique des cellules tumorales des tumeurs neuroendocrines (Anderson *et al.*, 2001 ; Pfeifer *et al.*, 2012).

Le radiotraceur $^{64}CuCl_2$ est utilisé comme biomarqueur dans des maladies génétiques rares où le métabolisme du cuivre est altéré, telles que la maladie de Wilson ou la maladie de Menkès (Gupte et Mumper, 2009 ; Wang et Chen, 2012 ; Niccoli Asabella *et al.*, 2014).

Récemment, des travaux ont été publiés concernant l'usage de complexes de ^{64}Cu avec des bis(thiosemicarbazones) comme radiotraceurs pour la TEP dans le cadre de la maladie d'Alzheimer (Hickey *et al.,* 2013 ; Hayne *et al.,* 2014). Cependant, cette famille de composés a tendance à précipiter en milieu aqueux. Une étude de sept membres de cette famille de composés effectuée dans notre groupe a montré qu'ils tendent à s'agréger dans le milieu extracellulaire et dans le cytosol. Cette accumulation dans le cytosol provoque une accumulation intracellulaire (Lambert *et al.*, 2013).

L'utilisation en ce contexte de macrocycles complexant le cuivre a été démontrée en 2016 avec l'utilisation du 1,4,7,10-tétraazacyclododécane (cyclam) et du do3a liés à des benzofurannes (Watanabe *et al.*, 2016). Ces complexes sont capables de détecter les plaques amyloïdes, mais ont une faible incorporation cérébrale.

2.4.2 La tomographie d'émission monophotonique

Le radioisotope le plus utilisé en TEMP est le ^{99m}Tc, qui émet des rayons gamma facilement détectables par des caméras appropriées. Sa demi-vie de 6,01 heures est compatible avec la biodistribution requise pour les expériences d'imagerie médicale chez l'humain (Ono et Saji, 2011). ^{99m}Tc ne requiert pas l'existence d'un cyclotron sur place, car il est produit aisément avec un générateur $^{99}Mo/^{99m}Tc$, ce qui le rend disponible 24 heures sur 24 (Oukoloff *et al*., 2015).

La sensibilité de la TEP est deux à trois fois plus grande que celle de la TEMP, cependant la disponibilité de cette dernière technique est plus élevée que celle de la TEP grâce à une utilisation plus facile et une rentabilité améliorée. Dans le contexte de la maladie d'Alzheimer, ces avantages ont motivé le développement de radiotraceurs comportant la liaison d'un complexe de ^{99m}Tc à des molécules capables de marquer les plaques amyloïdes (**Figure 13**). Cependant, aucune étude clinique n'a encore été faite à cause de leur faible incorporation dans le cerveau (Ono *et al.*, 2010a ; Ono et Saji, 2011 ; Eckroat *et al.*, 2013 ; Oukoloff *et al*., 2015 ; Wang *et al.*, 2015).

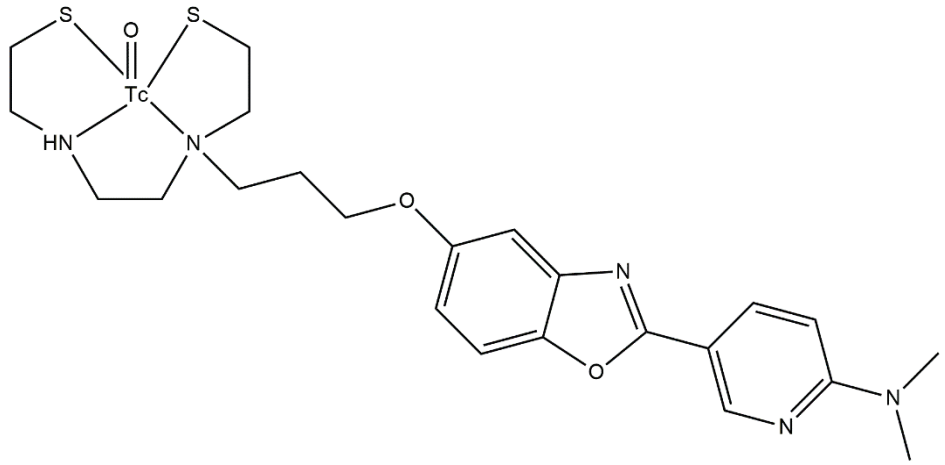


Figure 13 : Exemple d'un radiotraceur de TEMP dans lequel un noyau de ^{99m}Tc est lié à une structure capable de détecter le peptide Aβ. Ce complexe présenterait une entrée modérée dans le cerveau et une élimination rapide, faisant de lui, selon certains auteurs, un bon candidat pour des études cliniques (Wang *et al.*, 2015).

2.5 L'imagerie par résonance magnétique

L'IRM est basée sur le phénomène physique de résonance magnétique nucléaire (RMN). Il s'agit d'observer la RMN des protons de l'eau contenue dans l'organisme, c'est à dire la réponse des noyaux soumis à un champ magnétique extérieur et à une excitation électromagnétique. L'intensité recueillie pour un élément de volume (voxel)

dépend de la concentration de l'eau à l'endroit considéré. On obtient ainsi une image tridimensionnelle de la répartition de l'eau dans le corps d'un patient. En effet, l'eau constitue environ 70 % du corps humain et le proton ^{1}H est naturellement abondant et très sensible en RMN (Borel *et al.*, 2001).

L'IRM est la technique la plus utilisée pour l'imagerie de tissus mous tels que le cerveau. Des altérations structurelles et fonctionnelles comme l'atrophie, des dysfonctionnements vasculaires ou des altérations du volume de l'hippocampe peuvent être étudiés par IRM pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer (Colliot *et al.*, 2013 ; Teipel *et al.*, 2013). L'IRM fonctionnelle peut être utilisée pour étudier les modifications de l'activité neuronale chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Chen *et al.*, 2011 ; Petrella *et al.*, 2011). L'atrophie structurale peut être détectée par IRM même dans le stade préclinique de la maladie (Ridha *et al.*, 2006). Une étude de la densité de la substance grise a montré que des changements dans des régions affectées par la neuropathologie de la maladie d'Alzheimer peuvent être détectés plusieurs années avant l'apparition du déclin cognitif (Tondelli *et al.*, 2012).

Dans le contexte de détection des plaques amyloïdes, l'IRM est une technique complémentaire de la TEP. Bien que la sensibilité de la TEP soit supérieure à celle de l'IRM, cette dernière technique permet une résolution spatiale plus élevée, qui selon certains auteurs permettrait la détection individuelle et différentiée de plaques amyloïdes dans le cerveau (Aime *et al.*, 2002 ; Prodi *et al.*, 2015). Seule l'IRM permet la résolution submillimétrique nécessaire pour la visualisation des sous-régions de l'hippocampe, qui sont affectées diversement dans la maladie d'Alzheimer. De plus, il faut souligner que, dans un cadre clinique, l'absence de radioactivité durant l'acquisition de l'image d'IRM est un avantage significatif (Huddleston et Small, 2005).

Lors des dernières étapes de la maladie, les plaques amyloïdes contiennent une très forte concentration en fer, ce qui permet leur visualisation individuelle chez la souris. Cependant, cela requiert des champs magnétiques assez puissants (> 7 T) et des temps

d'acquisition longs, qui ne sont pas très bien adaptés dans un environnement clinique (Benveniste *et al.*, 1999 ; Jack *et al.*, 2004 ; Vanhoutte *et al.*, 2005 ; Nakada *et al.*, 2008). Seules les plaques avec des diamètres environ 50 µm peuvent être observées avec des temps d'acquisition raisonnables de moins de deux heures (Wadghiri *et al.*, 2013). De plus, l'accumulation du fer dans les plaques amyloïdes, responsable de ce contraste spontané, n'est pas homogène entre les différentes régions du cerveau (Falangola *et al.*, 2005 ; Dhenain *et al.*, 2009).

2.6 Les agents de contraste pour l'IRM

L'utilisation d'agents de contraste permet d'augmenter le contraste dans l'image obtenue par IRM. L'influence locale des agents de contraste sur les molécules d'eau cause un signal brillant, ou « hyperintense », ou un signal foncé, ou « hypointense », en fonction de différentes séquences d'acquisition et le type d'agent de contraste utilisé. Les agents de contraste modifient, par un mécanisme d'interaction dipolaire, le moment magnétique nucléaire des protons, modifiant ainsi le temps de relaxation, c'est-à-dire, le temps nécessaire pour que les protons retournent à la situation d'équilibre. Le temps de relaxation T_1 est le temps nécessaire pour que le vecteur magnétique retourne à l'équilibre longitudinal. Le temps de relaxation T_2 quantifie la diminution de la magnétisation transversale, conséquence du déphase des spins.

Aujourd'hui, la presque totalité des agents de contraste disponibles commercialement sont des agents paramagnétiques basés sur des chélates de Gd^{3+} qui modifient efficacement le temps de relaxation T_1, produisant un signal hyperintense avec des séquences optimisés en T_1. Le Gd^{3+} a sept électrons non appariés lui donnant un fort moment magnétique et des propriétés paramagnétiques intéressantes (Aime *et al.*, 2002 ; Bonnet et Tóth, 2016). D'autres agents de contraste basés sur l'ion Mn^{2+} ont été utilisés antérieurement mais ses propriétés paramagnétiques sont plus faibles.

Le rayon ionique du Gd^{3+} est très similaire à celui du Ca^{2+}. Le Gd^{3+} libre est toxique pouvant replacer le Ca^{2+} dans des milieux biologiques, ce qui exige l'administration

de chélates stables de Gd^{3+} empêchant la libération des ions Gd^{3+} dans l'organisme. Pour éviter une toxicité *in vivo*, les chélates de Gd^{+3} doivent être thermodynamiquement stables et cinétiquement inertes, en ce qui concerne la dissociation du métal [éq. 1], et la transmétallation avec des métaux présents dans le corps humain, comme Fe^{2+}, Ca^{2+}, Cu^{2+}, ou Zn^{2+} [éq. 2], ou l'échange de ligands [éq.3] (Idée *et al.*, 2009).

$$GdLn \leftrightarrows Gd^{3+} + Ln^{3-} \quad [1]$$

$$GdLn + M^{2+} \leftrightarrows Gd^{3+} + ML^{n-1} \quad [2]$$

$$GdL + L' \leftrightarrows GdL' + L \quad [3]$$

Les premiers agents de contraste approuvés pour leur utilisation en clinique étaient composés par des ligands linéaires comme le dtpa. Ils s'éliminaient aisément du corps de la plupart des patients, mais pouvaient rester pendant des jours dans le corps de patients souffrant d'insuffisance rénale chronique (Grobner, 2006).

Cette préoccupation a amené à l'utilisation de macrocycles pour complexer le Gd^{3+} lors de son usage en imagerie. Les complexes macrocycliques ont une stabilité *in vivo* plus élevée que leurs analogues linéaires (Sherry *et al.*, 2009). L'effet macrocyclique confère aux complexes métalliques macrocycliques une stabilité thermodynamique plus élevée par rapport à leurs analogues linéaires (Cabbiness et Margerum, 1969). L'effet macrocyclique contribue aussi à l'inertie cinétique, qui est le facteur plus important à considérer lorsqu'on veut éviter la dissociation du métal *in vivo* (Idée *et al.*, 2009 ; Sherry *et al.*, 2009). L'inertie cinétique prédit avec plus de précision la décomplexation *in vivo* des complexes de Gd^{3+} utilisés comme agents de contraste pour l'IRM (Wedeking *et al.*, 1992 ; Sarka *et al.*, 2002).

La stabilité des complexes macrocycliques permet d'éviter la libération du Gd^{3+} dans les conditions utilisées pour l'imagerie médicale (Idée *et al.*, 2009). Leurs vitesses

de dissociation sont complètement négligeables dans le sérum humain à pH = 7, avec des durées de vie extrapolées à partir d'expériences en milieu acide de plus de 1000 ans (Frenzel *et al.*, 2008 ; Hao *et al.*, 2012). De cette manière, l'ion métallique est séquestré et entouré par un environnement isolant qui le sépare du milieu biologique limitant ainsi sa toxicité.

Chez les patients présentant une insuffisance rénale sévère, l'utilisation de chélates linéaires complexés à Gd^{3+} provoque une fibrose systémique néphrogénique (FSN), probablement à cause de la décomplexation (Pierre *et al.*, 2014). Aux Etats Unis, la FDA est en train d'évaluer le risque de l'utilisation des chélates de Gd^{3+} comme agents de contraste, après la découverte de dépôts de gadolinium dans les cerveaux de patients qui ont reçu plusieurs doses de ces chélates, même dans le cas de ceux ayant une fonction rénale normale (Errante *et al.*, 2014 ; U.S. Food and Drug Administration, 2015 ; Kanda *et al.*, 2016). Il a été suggéré que la transmétallation avec du zinc ou du fer lors de l'utilisation des ligands linéaires est à l'origine de ce phénomène (Errante *et al.*, 2014 ; Kanda *et al.*, 2015 ; Radbruch *et al.*, 2015 ; Robert *et al.*, 2015).

D'autres agents de contraste proposés pour l'IRM sont les nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer, qui jouent un rôle sur le temps de relaxation T_2, produisant un signal hypointense. Les propriétés magnétiques de ces nanoparticules sont supérieures à celles des chélates de Gd^{3+} (Lin *et al.*, 2008). Cependant, elles présentent des problèmes liés à leur pharmacocinétique et une toxicité élevée. Par ailleurs, dans le contexte de l'imagerie cérébrale, leur capacité à traverser la BHE est négligeable. Aujourd'hui, la plupart de ces agents de contraste ont été retirés du marché en faveur des chélates de Gd^{3+} (Wang, 2015).

2.7 La visualisation des plaques amyloïdes par IRM en utilisant des agents de contraste

2.7.1 Les agents de contraste non-spécifiques

Selon certains auteurs, l'utilisation d'agents de contraste dans le cerveau pourrait permettre la visualisation des plaques amyloïdes par IRM (Aime *et al.*, 2002 ; Prodi *et al.*, 2015). Cependant, les agents de contraste commerciaux tels que le $[Gd(dtpa)]^{2-}$ ou le $[Gd(dota)]^{-}$ ne traversent pas la BHE chez les individus sains. En effet, ils sont utilisés en clinique pour la détection d'atteintes au niveau de la BHE comme celles trouvées dans le cas de la sclérose multiple (Runge *et al.*, 1985 ; Filippi et Grossman, 2002).

L'injection intracérébroventriculaire de $[Gd(dota)]^{-}$ peut être utilisée pour la détection de plaques amyloïdes *in vivo* chez la souris. Avec cette méthode d'administration, le complexe hydrophile $[Gd(dota)]^{-}$ se répand rapidement dans tout le cerveau, créant un contraste entre le parenchyme et les plaques amyloïdes hydrophobes. Par conséquent, les plaques amyloïdes sont visibles comme des points hypointenses dans l'image d'IRM (Petiet *et al.*, 2012). Santin et collaborateurs proposent une méthode pour détecter les plaques amyloïdes avec une combinaison de $[Gd(dota)]^{-}$ et l'application d'ultrasons non focalisés et de microbulles pour ouvrir de façon transitoire la BHE. Cette méthode permet des temps d'acquisition courts (32 min) et une résolution élevée (29 μm) (Santin *et al.*, 2013). Toutefois, l'ouverture de la BHE avec des ultrasons n'est pas encore considérée comme inoffensive pour les patients, car toute ouverture de cette barrière, même transitoire, pourrait permettre le passage de molécules exogènes ou des virus entraînant des lésions sérieuses et irréversibles (Tranquart *et al.*, 2014).

2.7.2 Les agents de contraste spécifiques

Un agent de contraste idéal pour l'imagerie des plaques amyloïdes doit : (i) traverser la BHE, (ii) se lier au peptide Aβ de façon spécifique et réversible, (iii) ne

pas être toxique, (iv) ne pas être métabolisé pendant le temps qu'il reste dans le corps du patient, et (v) s'éliminer aisément du corps du patient (Klunk *et al.*, 2004 ; Klunk et Mathis, 2008 ; Fodero-Tavoletti *et al.*, 2009). Il devrait évidemment garder sa capacité à modifier les temps de relaxation de l'eau même lorsqu'il interagit avec les plaques amyloïdes. L'obstacle le plus important pour l'utilisation clinique de ces composés est leur faible capacité à traverser la BHE et donc à être internalisés dans le cerveau.

Neuf agents ont été approuvés pour leur utilisation clinique aux Etats-Unis et dans l'Union Européenne, qui peuvent se diviser en fonction de leur nature macrocyclique ou linéaire, et de leur nature ionique ou non-ionique (**Tableau 3**) (Runge, 2016). La plupart de ces complexes sont utilisés purement comme des agents de contraste extracellulaire. L'acide gadoxétique et le gadobenate sont, en plus, utilisés pour l'imagerie du foie car ils s'incorporent spécifiquement dans les hépatocytes grâce à des récepteurs membranaires avec transport actif (Aime et Caravan, 2009 ; Reimer et Vosshenrich, 2010).

Deux nanoparticules d'oxyde de fer, Feridex® (ferumoxides) et Resovist® (ferucarbotran), et un chélate de Mn^{2+}, Teslascan® (mangafodipir) avaient été approuvés mais ils ont été retirés du marché à cause de problèmes de toxicité et une faible rentabilité économique. Les complexes de Gd^{3+} approuvés comme agents de contraste pour l'IRM (**Figure 14**) ont des propriétés favorables en termes de l'augmentation du temps de relaxation, mais aussi une bonne biodistribution, une élimination efficace de l'organisme après l'examen médical, et une stabilité élevée aussi bien de point de vue thermodynamique que cinétique (Port *et al.*, 2008 ; Frullano et Caravan, 2011 ; Zhou et Lu, 2013).

Ces agents de contraste commerciaux ont des relaxivités r_1 similaires, entre 3,5 et 3,8 $mM^{-1}\ s^{-1}$ à 20 MHz et 37 °C (Zhou et Lu, 2013). Des agents de contraste de Gd^{3+} avec des relaxivités équivalentes à celles des agents de contraste actuels pourraient être détectés à l'intérieur du cerveau à des concentrations de l'ordre de 1-10 μM, le

même ordre de grandeur que la concentration des plaques amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer (Aime *et al.*, 2002 ; Caravan, 2006 ; Bort *et al.*, 2014). Après la fixation aux plaques amyloïdes, la diminution du taux de rotation du chélate pourrait induire une relaxivité plus élevée (Rohrer *et al.*, 2005). La relaxivité des chélates de Gd^{3+} augmente en présence de concentrations équimolaires du peptide Aβ (1-40) (Martins *et al.*, 2013).

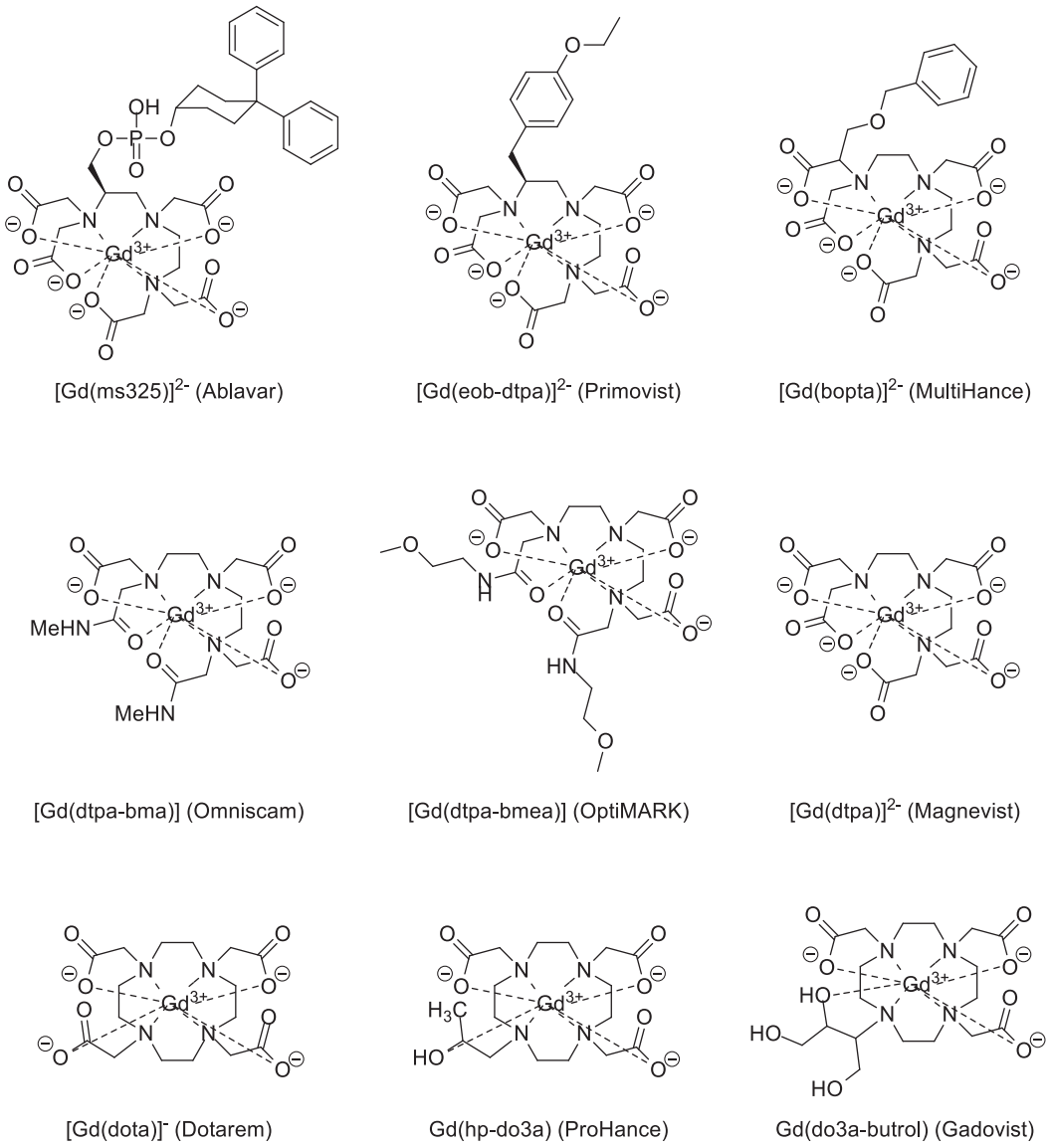


Figure 14 : Structure chimique des agents de contraste de gadolinium actuellement disponibles commercialement (Runge, 2016). Les noms commerciaux (®) sont indiqués entre parenthèse.

Tableau 3 : Chélates de Gd^{3+} disponibles commercialement comme agents de contraste aux Etats-Unis ou dans l'Union Européenne (Runge, 2016).

	Ionique	**Non-ionique**
Macrocyclique	**Gadoterate meglumine** (Dotarem ; Guerbet Group)	**Gadoteridol** (ProHance ; Bracco Imaging) **Gadobutrol** (Gadavist ; Bayer HealthCare)
Linéaire	**Gadopentetate dimeglumine** (Magnevist ; Bayer HealthCare) **Gadobenate dimeglumine** (MultiHance ; Bracco Imaging) **Gadoxetate disodium** (Primovist ; Bayer HealthCare) **Gadofosveset trisodium** (Ablavar ; Lantheus)	**Gadodiamide** (Omniscan ; GE Healthcare) **Gadoversetamide** (Optimark ; GuerbetGroup),

En 2002, le premier essai de synthèse d'un agent de contraste utilisable en IRM ciblant le peptide Aβ a été publié (Poduslo *et al.*, 2002). Dans cette étude effectuée chez des souris modèles transgéniques de la maladie d'Alzheimer, un chélate de $[Gd(dtpa)]^{2-}$ a été attaché à un peptide Aβ (1-40) et modifié avec la putrescine pour améliorer le passage de la BHE. Cette étude, quoiqu'innovante, demandait des temps d'acquisition très élevés et des champs magnétiques très puissants (> 7 T), peu pratiques pour l'utilisation clinique car les appareils d'IRM disponibles aujourd'hui ont des champs magnétiques compris entre 1,5 ou 3 T (Sillerud *et al.*, 2013).

Des complexes de $[Gd(dtpa)]^{2-}$ fonctionnalisées avec des peptides Aβ (1-40) n'étaient pas capables de traverser la BHE, et nécessitaient son ouverture avec une injection de mannitol (Wadghiri *et al.*, 2003). Les propriétés de passage de la BHE furent améliorés grâce à une modification synthétique de la partie Aβ (Poduslo *et al.*, 2004 ; Wengenack *et al.*, 2008). Cependant, aucune étude clinique n'a encore été faite avec ces complexes.

Poduslo et collaborateurs ont également développé des agents de contraste basés sur l'anticorps monoclonal anti-Aβ IgG4.1. Un fragment synthétique de cet anticorps modifié avec la putrescine, nommé $pF(ab')_2$4.1, est capable de se lier aux plaques amyloïdes (Poduslo *et al.*, 2007). Quand le $pF(ab')_2$4.1 est conjugué au $[Gd(dota)]^-$, les plaques amyloïdes peuvent être, après deux heures d'incubation, visualisées par IRM dans des coupes de cerveau de souris (Ramakrishnan *et al.*, 2008). L'agent de contraste résultant ne traverse pas la BHE.

Plusieurs complexes basés sur la liaison de [Gd(do3a)] (**Figure 15**) au PiB ont été étudiés par Martins et collaborateurs (Martins *et al.*, 2013, 2014). Différents espaceurs entre le macrocycle do3a et le PiB ont été étudiés, et les résultats obtenus montrent que ceux-ci modulent l'affinité aux plaques amyloïdes. Les affinités de ces complexes sont de plusieurs ordres de grandeur plus faibles que celle du PiB seul, montrant l'influence du complexe macrocyclique sur l'interaction entre le PiB et le peptide Aβ. En dépit de ces affinités plus basses, les complexes offraient un marquage équivalent au PiB ou la thioflavine S dans des coupes de cerveau humain obtenues à partir de patients décédés et dont le diagnostic d'Alzheimer a été avéré. La biodistribution *in vivo* chez la souris suggère que les complexes sont éliminés rapidement. Cependant, ils ont une faible incorporation au niveau cérébrale.

Le curcumine a aussi été étudiée comme une structure capable de se lier aux plaques amyloïdes (Garcia-Alloza *et al.*, 2007). Un dérivé de curcumine basé sur le $[Gd(dtpa)]^{2-}$, capable d'interagir avec les plaques amyloïdes, a été synthétisé mais son action *in vivo* n'a pas été étudié (Vithanarachchi et Allen, 2013). Un autre dérivé du

curcumine impliquant $[Gd(dota)]^-$ (**Figure 15**) marque les plaques amyloïdes dans des cerveaux humains et de souris *ex vivo* (Patil *et al.*, 2015).

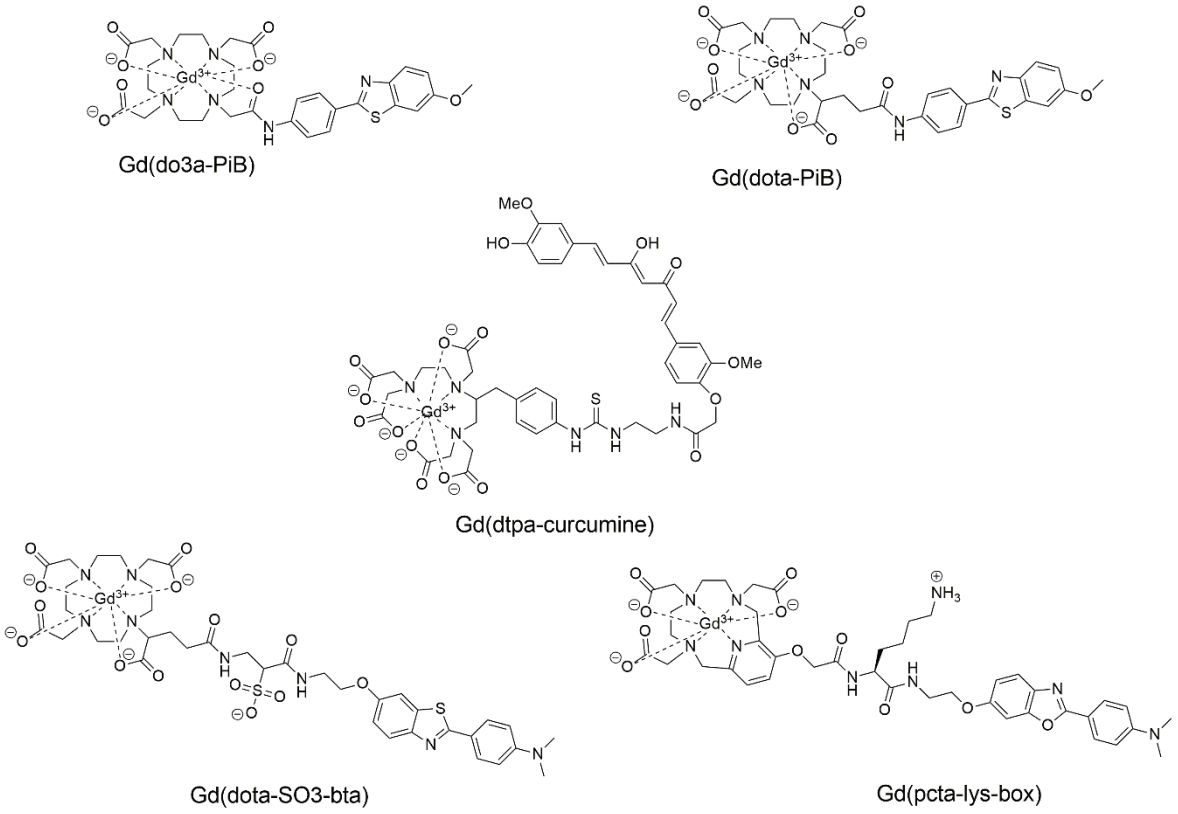


Figure 15 : Structure de plusieurs complexes de Gd^{3+} proposés dans la littérature pour la détection des plaques amyloïdes. Gd(do3a-PiB), (Martins *et al.*, 2013) ; Gd(dota-PiB), (Martins *et al.*, 2016) ; Gd(dtpa-curcumine), (Vithanarachchi et Allen, 2013) ; Gd(dota-SO3-bta) et Gd(pcta-lys-box), (Bort *et al.*, 2014).

Aucun composé parmi une série de complexes basés sur le $[Gd(dota)]^-$ et le [Gd(pcta)] (**Figure 15**) n'a été capable de traverser la BHE dans un modèle *in vitro*, même s'ils sont chargés positivement à pH physiologique (Bort *et al.*, 2014). Une étude de la relation structure-activité a montré que les charges négatives dans le complexe gênent la liaison aux plaques amyloïdes. La présence d'un long espaceur séparant le complexe de la structure qui détecte les plaques amyloïdes améliore l'affinité des molécules pour le peptide Aβ.

Comme indiqué précédemment, le passage à travers la BHE est l'obstacle le plus important pour le développement d'agents de contraste visant les plaques amyloïdes. Lors de travaux réalisés dans notre laboratoire il a été montré que l'incorporation intracellulaire, nécessaire pour le passage de la BHE, dépend fortement de la lipophilie et la charge des complexes (Darghal *et al.*, 2010).

2.8 Les molécules pour ^{19}F IRM

L'utilisation de molécules présentant des atomes de ^{19}F comme isotope détectable en IRM a été proposée pour la détection des plaques amyloïdes. ^{19}F a une abondance isotopique de 100 %, une sensitivité proche à celle de ^{1}H, et un signal de fond minime (Higuchi *et al.*, 2005 ; Yanagisawa *et al.*, 2011, 2014 ; Amiri *et al.*, 2015). Ces molécules ne sont pas des agents de contraste car elles n'affectent pas les temps de relaxation des protons de l'eau. Par contre, elles sont détectées grâce au signal de l'isotope ^{19}F présent dans la structure. Quoique prometteuse, cette technique exige une concentration élevée au niveau cérébrale et souffre d'une faible sensibilité et, plus notablement, une basse résolution, car les appareils et les séquences d'acquisition d'IRM sont souvent optimisés pour le ^{1}H et non pour le ^{19}F (Baltes *et al.*, 2011 ; Yanagisawa *et al.*, 2014).

2.9 Utilisation intracérébrale des complexes métalliques

Comme on l'a vu préalablement, les complexes métalliques sont des outils potentiellement intéressants dans les différentes techniques d'imagerie médicale pour une utilisation intracérébrale, étant donné que (i) l'usage de complexes de ^{64}Cu permettrait d'augmenter la demi-vie du radioisotope par rapport au ^{18}F ou ^{11}C, dans le cas de la TEP ; (ii) des complexes de ^{99m}Tc pourraient permettre l'application de la technique TEMP ; et (iii) des complexes de Gd seraient utilisables comme agents de contraste dans l'IRM.

Cependant, l'utilisation intracérébrale de ces complexes, et plus précisément, l'application à la détection des plaques amyloïdes dans le cadre du diagnostic de la

maladie d'Alzheimer a été limitée par la faible incorporation de ces complexes dans le cerveau. En effet, le passage de la BHE reste l'obstacle le plus difficile à surmonter dans le développement de ces complexes.

Ainsi, dans cette thèse doctorale, et comme on montrera dans les chapitres suivants, nous avons envisagé la synthèse des complexes métalliques macrocycliques capables de détecter les plaques amyloïdes et utilisables en imagerie cérébrale, qui seraient composés d'un noyau macrocyclique qui complexe le métal évitant sa libération dans le corps tout en conservant son activité liée à l'imagerie médicale, un espaceur qui pourrait contribuer à la stabilité du complexe, et une molécule capable de marquer spécifiquement les plaques amyloïdes.

Le choix du macrocycle à utiliser comme squelette de ce complexe doit tenir en compte le passage de la BHE, et notamment les interactions avec la membrane plasmique des cellules endothéliales de la BHE, ce qui est la première étape de ce passage. Ainsi, à cause de la présence du potentiel de membrane négatif dans cette membrane, il existe une préférence vers des molécules avec charge neutre ou positive. Ces molécules doivent aussi être lipophiles pour favoriser l'interaction avec la bicouche lipidique, et elles doivent être petites pour rendre possible le transport transmembranaire. Également, il est nécessaire d'évaluer le transport par des protéines d'efflux qui sont présentes dans la BHE, comme la P-gp.

Ces considérations nous ont conduits à la réalisation des travaux expliqués dans le chapitre 4, après le chapitre 3 décrivant les matériels et méthodes utilisés.

Chapitre 3.
Matériels et méthodes

« Considerate la vostra semenza:
fatti non foste a viver come bruti,
ma per seguir virtute e canoscenza »
Pensez à ce que vous êtes :
point n'avez été faits pour vivre comme des brutes,
mais pour rechercher la vertu et la connaissance.

Dante Alighieri, La Divine Comédie (L'Enfer, XXVI)

3.1 Produits chimiques

Les produits chimiques ont été achetés chez Sigma-Aldrich, Alfa-Aesar, Fisher, et Acros Organics et ils ont été utilisés sans purification supplémentaire. L'acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique (dota) a été fourni par le Professeur Carlos Geraldes (Université de Coimbra, Portugal). L'acide 6-((1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan-1-yl)méthyl)picolinique (te1pa) et l'acide 6,6'-((1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,7-diyl)bis(méthylène)) dipicolinique (do2pa) ont été fournis par le Professeur Raphaël Tripier (Université de Bretagne Occidentale, France). Les complexes $[Eu(dota)]^-$, $[Cu(te1pa)]^+$ et $[Eu(do2pa)]^+$ ont été synthétisés selon des protocoles déjà publiés (Darghal *et al.*, 2010 ; Lima *et al.*, 2012 ; Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2012). Les inhibiteurs de la P-glycoprotéine (P-gp) ont été fournis par le Professeur Elisabetta Teodori (Université de Florence, Italie), et solubilisés dans le diméthylsulfoxyde (DMSO).

Tous les solvants utilisés pour la synthèse organique ont été distillés avant leur utilisation selon des protocoles du livre « Purification of Laboratory Chemicals » (Armarego et Chai, 2003). La diméthylformamide et le dioxanne ont été séchés avec du $MgSO_4$, et distillés après filtration. L'éthanol, le méthanol, le toluène et l'acétonitrile ont été distillés sous vide sur CaH_2. L'inertage des montages expérimentaux a été effectué à l'argon ou à l'azote.

Avant toute expérience, la concentration du métal dans les solutions mères des complexes a été déterminée par spectroscopie d'absorption atomique. Les solutions mères d'$EuCl_3$ et $Cu(ClO_4)_2$ et des complexes métalliques $[Cu(te1pa)]^+$ et $[Eu(do2pa)]^+$ ont été préparées dans l'eau à une concentration d'environ 8 mM.

Le volume d'éthanol et de DMSO utilisé dans les expériences réalisées avec des cellules a toujours été inférieur à 0,5 % du volume final. Toute dilution d'une solution, ainsi que toute indication d'usage d'eau fait allusion à l'eau ultra pure, et l'ajustement du pH a été fait avec NaOH ou HCl sauf indication expresse.

Le tampon HEPES/Na^+ est composé de NaCl (132 mM), KCl (3,5 mM), $MgCl_2$ (0,5 mM), $CaCl_2$ (1 mM) et HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) (20 mM), puis ajusté à pH = 7,3. Cette solution tampon, complétée par 5 mM de glucose, permet la survie des cellules durant les expériences.

Le tampon phosphate salin (*Phosphate buffered saline,* PBS) est composé de 4,3 mM Na_2HPO_4, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, et 1,4 mM KH_2PO_4, puis ajusté à pH 7,3.

Le triton X-100, dissout dans l'eau (4 % masse/volume) a été utilisé pour perméabiliser les membranes cellulaires.

Le carbonylcyanure-4-(trifluorométhoxy)phénylhydrazone (FCCP) est un agent ionophore qui dépolarise la membrane mitochondriale (**Figure 16**). La solution mère de FCCP a été préparée dans l'éthanol à une concentration de 1 mM et conservée à -20 °C. Le FCCP est ajouté à une concentration finale de 1 µM juste après l'ajout du glucose avec un temps d'incubation d'une minute.

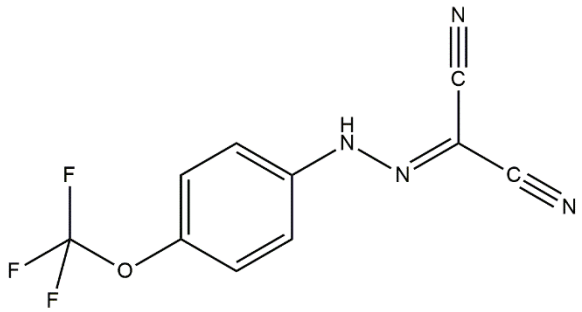


Figure 16 : Structure du FCCP

Les solutions mères de tétraméthylrosamine (TMR) (Molecular Probes) ont été préparées dans le DMSO à 10^{-2} M et stockées à -20 °C. Elles ont été diluées dans de l'eau au moment de l'expérience avec les cellules. La TMR doit être protégée de la lumière.

Les solutions mères de pirarubicine ont été préparées dans le DMSO et stockées à -20 °C. Ensuite, ces solutions ont été diluées avec de l'eau juste avant leur utilisation. La concentration de pirarubicine a été déterminée par absorption dans le visible sachant que la valeur du coefficient d'absorption molaire à 480 nm est égale à 11500 M^{-1} cm^{-1} pour des concentrations inférieures à 30 µM (Frezard et Garnier-Suillerot, 1991).

Les solutions d'arsénazo III ont été préparées à l'abri de la lumière dans un tampon aqueux d'acide acétique 0,3 % à pH = 5,8.

3.2 Appareils utilisés.

Le spectrophotomètre d'absorption UV-visible.

Un spectrophotomètre CARY 300 Scan à double faisceau a été utilisé pour enregistrer les spectres d'absorption UV-visible à température ambiante avec des cuves en quartz de 10 mm de trajet optique.

Le spectromètre d'absorption atomique.

Un spectrophotomètre VARIAN de type spectrAA-Zeeman 220, contrôlé par le logiciel spectrAA, a été utilisé pour déterminer les concentrations de cuivre et d'europium par spectroscopie d'absorption atomique (SAA).

Le spectrofluorimètre.

Un spectrofluorimètre Perkin Elmer LS50B couplé à un thermostat Thermomix 1441 – Frigomix 1495 a été utilisé pour enregistrer les spectres de fluorescence et l'évolution du signal fluorescent à 37 °C en fonction du temps. Le système d'agitation magnétique a été utilisé pour conserver les cellules en suspension homogène.

Le compteur de cellules.

Un compteur Beckman modèle Coulter Counter Z2 a été utilisé pour mesurer le nombre de cellules. La distribution gaussienne des tailles des cellules K562 et

K562/ADR dans la phase exponentielle a un maximum à 12,5 ± 1,2 µm, correspondant à un volume cellulaire moyen de 1,0 ± 0,3 x 10^{-12} litres.

Le pH-mètre.

Un pH-mètre Metrohm 603 a été utilisé pour effectuer les mesures de pH à température ambiante.

Les centrifugeuses.

Une centrifugeuse Eppendorf, modèle 5702R a été utilisée pour centrifuger des volumes supérieurs à 2 ml, à 150 g pendant 10 minutes. Des micro-centrifugeuses Capsule Tomy HF-120 ont été utilisées pour centrifuger des volumes inférieurs à 2 ml.

La cytométrie en flux

Un cytomètre en flux BD modèle Accuri C6, a été utilisé pour évaluer la viabilité des cellules SH-SY5Y en présence du complexe $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^{+}$, par l'incorporation intracellulaire de l'iodure de propidium (IP). La longueur d'onde d'excitation du laser est de 488 nm. La détection de fluorescence se fait dans trois canaux différents FL-1, FL-2 ou FL-3, cela dépend de la sonde fluorescente utilisée. Dans le cas de l'iodure de propidium, la fluorescence émise par les cellules a été détectée dans le canal FL-3 (670 nm). L'incorporation intracellulaire de l'ONO a été suivie à l'aide d'un cytomètre en flux BD modèle FACSCanto II. La longueur d'onde d'excitation du laser utilisé dans ce cas est de 407 nm et la fluorescence émise par les cellules a été detectée dans le canal bleu (425-475 nm). Dans la suite de cette thèse, nous nommerons l'intensité de fluorescence mesurée par cette technique « F_{cyto} ».

Les spectres RMN

Les spectres RMN ^{1}H, ^{13}C et ^{31}P des produits synthétisés à Brest (**1, 3-6, 9-14, 18**) ont été enregistrés avec des expériences 1D à température ambiante avec un spectromètre Bruker Advance 400 (^{1}H : 400 MHz, ^{13}C : 101 MHz, ^{31}P : 162 MHz) dans un solvant deutéré approprié au noyau concerné. Les spectres des produits synthétisés à Bobigny (**15-17**) ont été enregistrés avec un spectromètre Bruker Avance-III-400 (^{1}H : 400 MHz, etc), dans les mêmes conditions. Le déplacement

chimique (δ) est donné en ppm et les constantes de couplage *J* en Hz. Le pic du solvant non-deutéré a été utilisé pour calibrer les spectres de ^{1}H et ^{13}C ($CDCl_3$: 7,28 ppm, 77,16 ppm ; D_2O : 4,79 ppm, MeOD : 4,79 ppm ; 49,00 ppm), et H_3PO_4 (85 % dans l'eau) a été utilisé pour calibrer le ^{31}P. Les abréviations suivantes ont été utilisées pour indiquer la multiplicité : s (singulet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet), br (large, *broad*). Tous les spectres de ^{13}C et ^{31}P ont été enregistrés avec découplage du ^{1}H.

Les analyses par HRMS

Les analyses par spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) ont été réalisées dans la plate-forme HRMS de l'Institut de Chimie Organique et Analytique de l'Université d'Orléans.

3.3 Logiciels

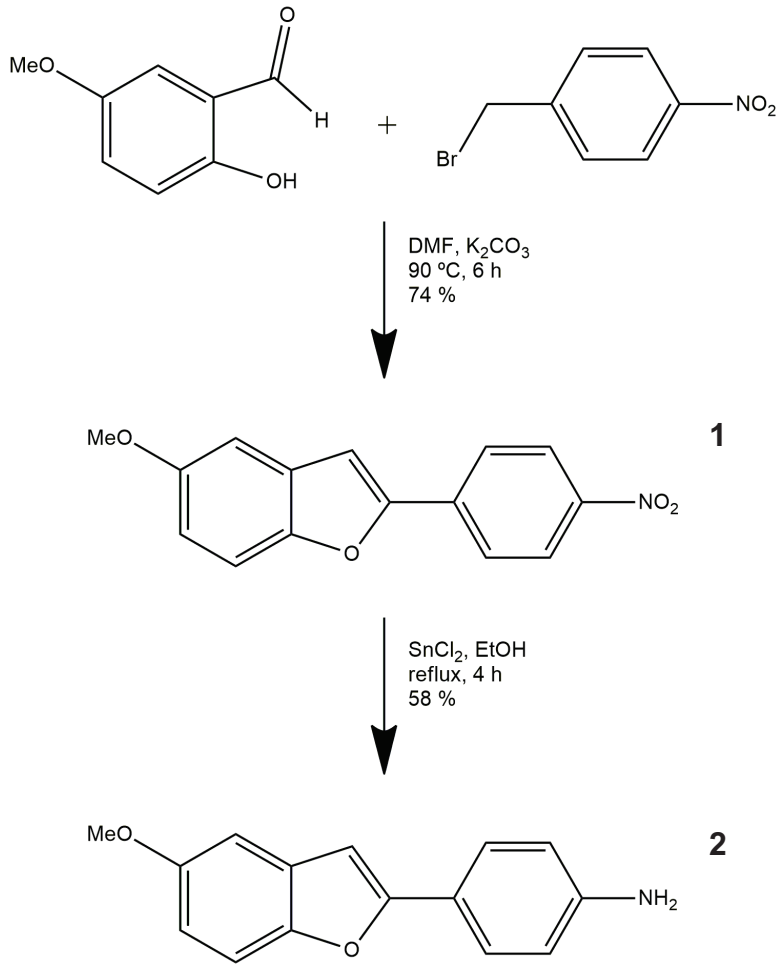
Les images qui permettent la visualisation tridimensionnelle des molécules ont été créées avec le logiciel Maestro (Schrödinger Inc). Les prédictions sur les propriétés d'intérêt pharmaceutique ont été obtenues avec le logiciel QikProp (Schrödinger Inc). La signification statistique des résultats a été évaluée avec le t-test de Student avec le logiciel GraphPad QuickCalcs (GraphPad Software). Les spectres RMN ont été analysés avec le logiciel MestReNova (Mestrelab Research S.L.).

3.4 Protocoles de synthèse chimique

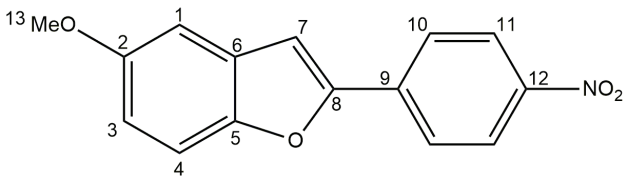
Avant de commencer la description de la méthodologie utilisée pour la synthèse organique, il est important de mentionner que la numérotation des atomes de carbone a été faite pour faciliter la compréhension des spectres RMN, mais elle est arbitraire et ne correspond pas aux locants qui marquent les substituants des chaînes principales.

3.4.1 Synthèse de la 4-(5-méthoxybenzofuran-2-yl)aniline (ONO)

La 4-(5-méthoxybenzofuran-2-yl)aniline (ONO), a été préparée selon le protocole d'Ono et collaborateurs (Ono *et al.*, 2010b).



(1)
5-méthoxy-2-(4-nitrophényl)benzofuranne
($C_{15}H_{11}NO_4$)



Le 2-hydroxy-5-méthoxybenzaldehyde (1,0 ml, 8,02 mmol, 1 eq) est mis en solution dans le diméthylformamide (40 ml). Le bromure de 4-nitrobenzyle (1,73 g, 8,02 mmol, 1 eq) et le carbonate de potassium (3,33 g, 24,06 mmol, 3 eq) sont introduits par petites portions à température ambiante. Une fois l'addition terminée, le mélange est chauffé à 90 °C pendant 6 heures. Après refroidissement de la solution à température ambiante, les solvants sont évaporés sous vide. Le résidu est repris dans le chloroforme (50 ml) et lavé avec de la saumure (2 x 25 ml). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium. Le solvant est évaporé sous vide. Le précipité est recristallisé avec un mélange d'éthanol et eau à parts égales pour obtenir le 5-méthoxy-2-(4-nitrophényl)benzofuranne sous forme d'un solide jaune (1,59 g, 5,93 mmol, 74 %).

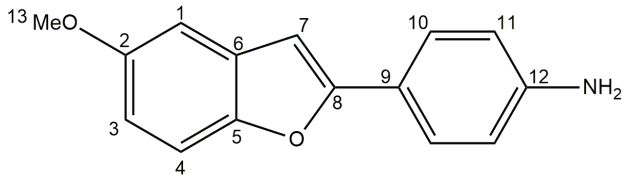
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25°C) : δ = 3,80 (s, 3H, H13), 6,69 (dd, 1H, H3, J = 9 Hz ; J = 2,6 Hz), 7,00 (d, 1H, H4, J = 9 Hz), 7,10 (s, 1H, H7), 7,37 (d, 1H, H1, J = 2,6 Hz), 7,89 (d, 2H, H10, J = 9 Hz), 8,22 (d, 2H, H11, J = 9 Hz).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$, 25°C) : δ = 55,91 (C13), 103,45 (C7), 105,23 (C1), 112,04 (C4), 115,00 (C3), 124,32 (C11), 129,21 (C10), 129,23 (C6), 136,34 (C9), 147,16 (C5), 150,55 (C12), 153,95 (C2), 156,42 (C8).

(2)

4-(5-méthoxybenzofuran-2-yl)aniline ; ONO

($C_{15}H_{13}NO_2$)

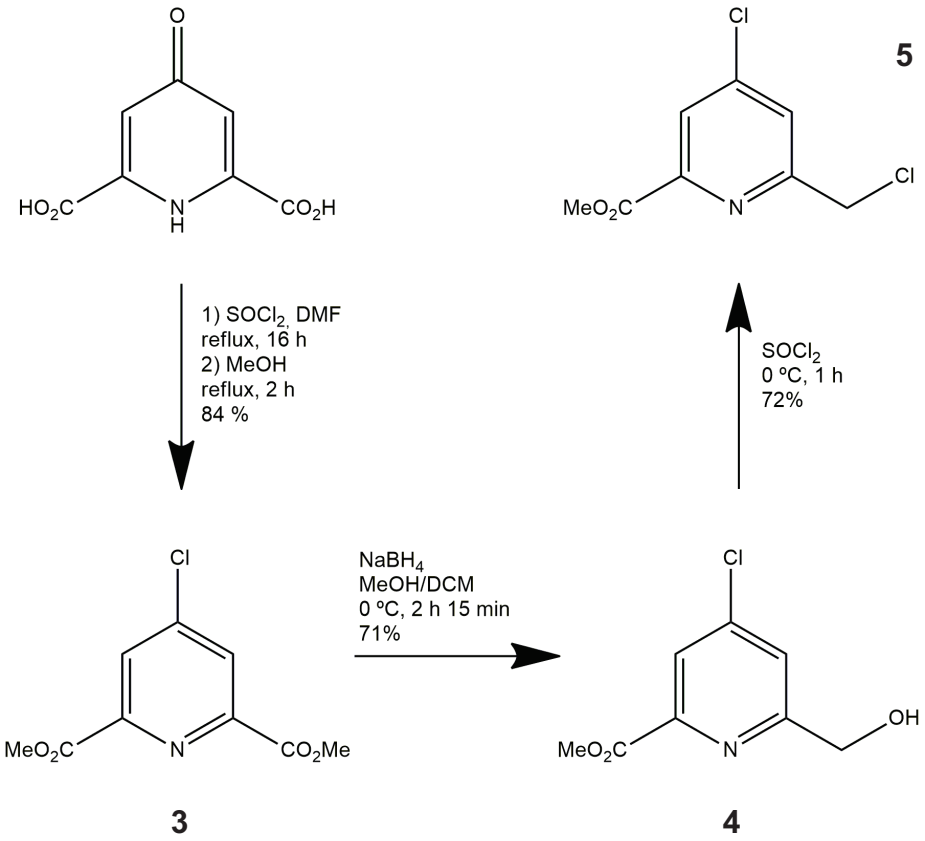


Le 5-méthoxy-2-(4-nitrophényl)benzofuranne **(1)** (1,44 g, 5,35 mmol, 1 eq) et le chlorure d'étain(II) (5,12 g, 27,0 mmol, 5,04 eq) sont mis en suspension dans l'éthanol (100 ml). Le mélange réactionnel est chauffé au reflux. La réaction est suivie par chromatographie sur couche mince (éluant : dichlorométhane / pentane 80 : 20) et arrêtée après 4 heures. Après refroidissement du mélange réactionnel jusqu'à température ambiante, l'hydroxyde de sodium 1 M est ajouté goutte à goutte jusqu'à l'obtention d'un pH basique (pH ~ 13-14). La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (2 x 50 ml). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, et le solvant est évaporé sous vide. On obtient l'ONO sous forme d'une poudre marron (0,746 g, 3,10 mmol, 58 %).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25°C) : δ = 3,87 (s, 3H, H13), 6,76 (d, 2H, H10, J = 8 Hz), 6,78 (s, 1H, H7), 6,86 (dd, 1H, H3, J = 8 Hz; J = 2,6 Hz), 7,02 (d, 1H, H1, J = 2,6 Hz), 7,37 (d, 1H, H4, J = 8 Hz), 7,67 (d, 2H, H11, J = 8 Hz).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$, 25°C) : δ = 55,92 (C13), 98,79 (C7), 103,07 (C1), 111,23 (C4), 111,78 (C3), 115,06 (C11), 126,34 (C10), 121,16 (C9), 130,25 (C6), 146,93 (C12), 149,56 (C5), 155,94 (C2), 157,53 (C8).

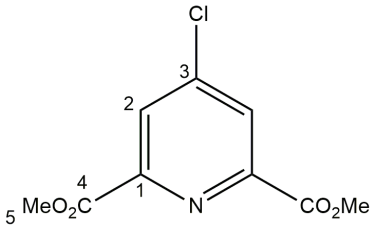
3.4.2 Synthèse du 4-chloro-6-(chlorométhyl)picolinate de méthyle



(3)

4-chloropyridine-2,6-dicarboxylate de diméthyle

($C_9H_8ClNO_4$)



Pour la synthèse de ce produit, nous avons adapté le protocole de Picot et collaborateurs (Picot *et al.*, 2008). L'acide chélidamique (2,77 g, 13,76 mmol, 1 eq) est mis en suspension dans le chlorure de thionyle (15 ml) à température ambiante. La diméthylformamide (1 ml, 6,5 mmol, 0,5 eq) est ajoutée goutte à goutte. Une fois l'addition terminée, le mélange réactionnel est chauffé au reflux pendant une nuit, puis refroidi à température ambiante. L'excès de chlorure de thionyle est évaporé et récuperé en utilisant une distillation « piège à piège ». Le précipité blanc est mis en solution dans le dichlorométhane (30 ml). La solution est refroidie à 0 °C dans un bain de glace puis le méthanol (45 ml) est ajouté goutte à goutte. La solution est chauffée à reflux pendant 2 heures. Après refroidissement de la solution jusqu'à température ambiante, le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est repris dans l'eau (40 ml). La phase aqueuse est extraite avec du dichlorométhane (2 x 40 ml). Les phases organiques réunies sont lavées avec de l'eau (20 ml) et de l'hydrogénocarbonate de sodium saturé (20 ml), et séchées sur sulfate de magnésium. Le solvant est évaporé sous vide pour obtenir le 4-chloropyridine-2,6-dicarboxylate de diméthyle sous forme d'un solide gris (2,83 g, 12,28 mmol, 89 %).

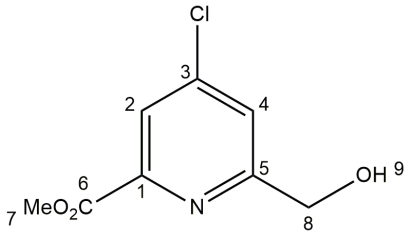
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25°C) : δ = 4,03 (s, 6H, H5), 8,30 (s, 2H, H2).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$, 25°C) : δ = 53,53 (C5), 128,34 (C2), 146,86 (C3), 149,42 (C1), 164,14 (C4).

(4)

4-chloro-6-(hydroxyméthyl)picolinate de méthyle

($C_8H_8ClNO_3$)



Le 4-chloropyridine-2,6-dicarboxylate de diméthyle **(3)** (1,20 g, 5,23 mmol, 1 eq) est mis en solution dans un mélange de méthanol et de dichlorométhane (80 ml / 20 ml). La solution est refroidie jusqu'à 0 ºC dans un bain de glace. Ensuite, un équivalent de borohydrure de sodium (198 mg, 5,23 mmol, 1 eq) est ajouté lentement. Après une heure, des additions de 0,25 eq de borohydrure de sodium sont faites toutes les 30 minutes. La réaction est suivie par chromatographie sur couche mince (éluant : acétate d'éthyle / cyclohexane 50 : 50) afin d'éviter la réduction de l'autre ester méthylique. Après l'addition totale de 1,75 eq de borohydrure de sodium (temps de réaction : 2 h 15 min), la réaction est arrêtée par acidification de la solution avec l'acide chlorhydrique 1 M jusqu'à pH ≈ 1-2. Le dichlorométhane est évaporé sous vide, puis l'hydroxyde de sodium 1 M est ajouté jusqu'à pH = 9. La phase aqueuse est extraite avec du chloroforme (2 x 30 ml). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et le solvant est évaporé sous vide. Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur colonne d'alumine (éluant : dichlorométhane / éther de pétrole 90 : 10). On obtient le 4-chloro-6-(hydroxyméthyl)picolinate de méthyle sous forme d'une poudre blanche (743,9 mg, 3,69 mmol, 71 %).

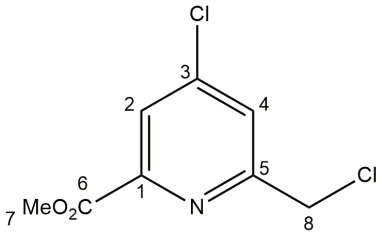
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25°C) : δ = 3,76 (t, 1H, H9, J = 4 Hz), 4,00 (s, 3H, H7), 4,87 (d, 2H, H8, J = 4 Hz), 7,62 (d, 1H, H4, J = 1,8 Hz), 8,00 (d, 1H, H2, J = 1,8 Hz).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$, 25°C) : δ = 53,20 (C7), 64,48 (C8), 124,08 (C2), 124,22 (C4), 146,01 (C3), 148,17 (C1), 162,22 (C5) 164,54 (C6).

(5)

4-chloro-6-(chlorométhyl)picolinate de méthyle

($C_8H_7Cl_2NO_2$)



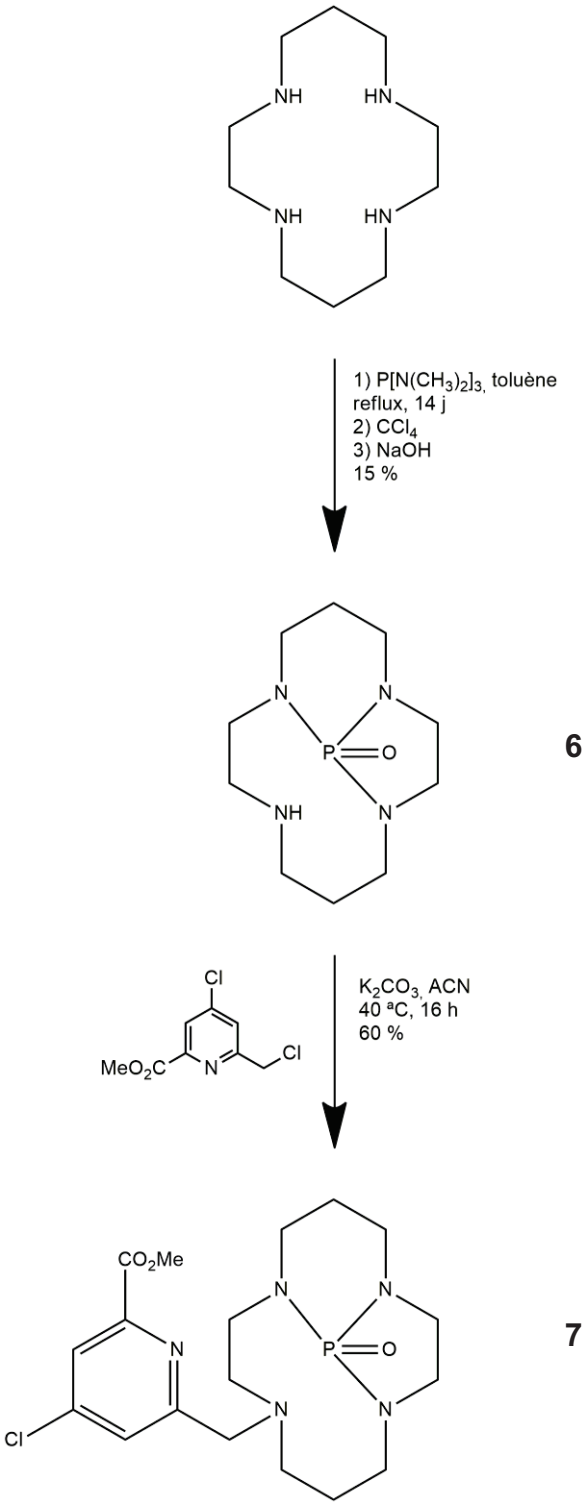
Le 4-chloro-6-(hydroxyméthyl)picolinate de méthyle **(4)** (2,82 g, 16,87 mmol, 1 eq) est dégazé et refroidi jusqu'à 0 ºC dans un bain de glace. Le chlorure de thionyle (15 ml) est ajouté goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité à 0 ºC pendant une heure. L'excès de chlorure de thionyle est évaporé et repris en utilisant une distillation « piège à piège ». Le résidu est mis en solution dans le toluène (150 ml). La phase organique est extraite avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (2 x 20 ml). La phase organique est lavée avec de l'eau (20 ml), séchée sur sulfate de magnésium et le solvant est évaporé sous vide. Après l'addition de l'éther (30 ml) la formation d'un précipité blanc est observée. Le précipité est filtré puis séché sous vide. On obtient le 4-chloro-6-(chlorométhyl)picolinate de méthyle sous forme d'une poudre blanche (2,65 g, 12,06 mmol, 72 %).

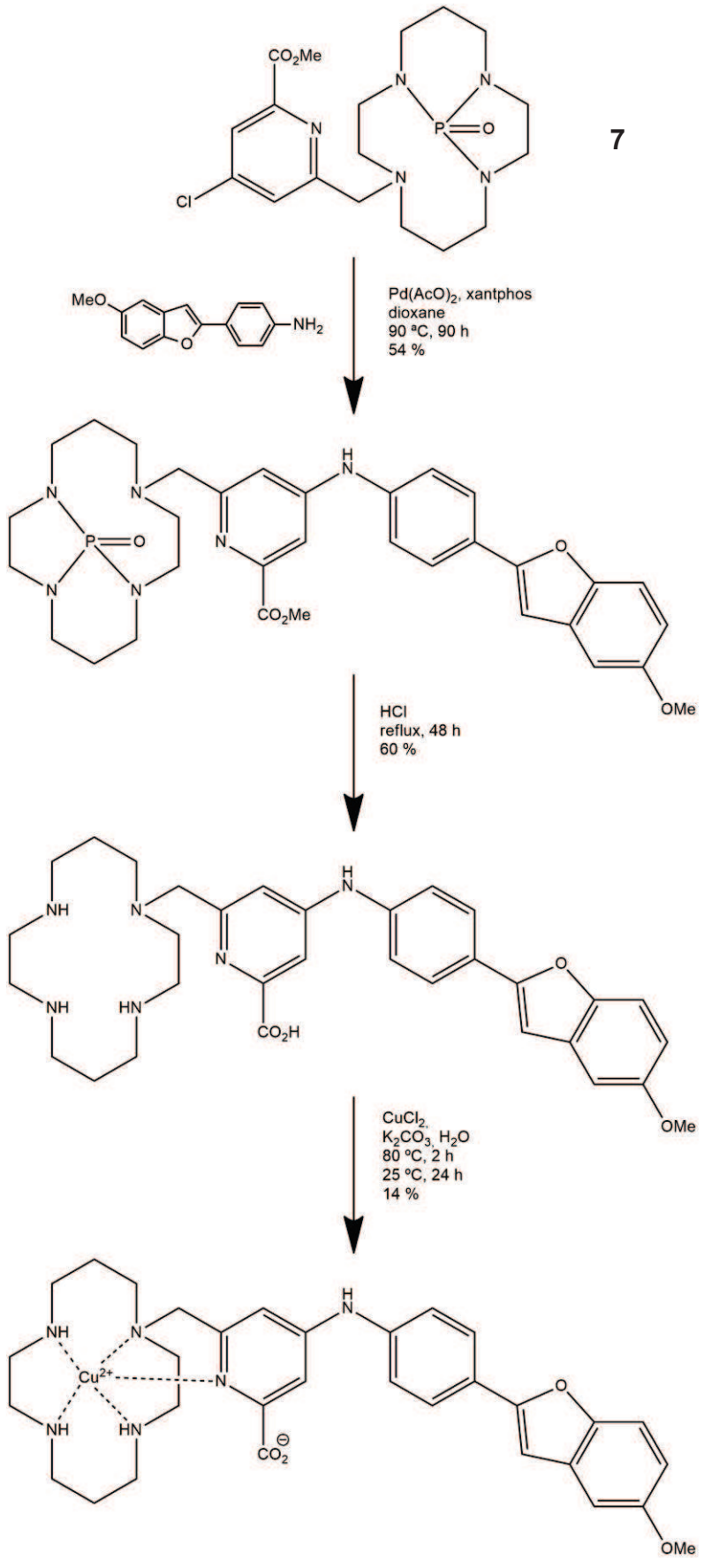
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25°C) : δ = 4,01 (s, 3H, H7), 4,74 (s, 2H, H8), 7,75 (d, 1H, H4, J = 1,7 Hz), 8,06 (d, 1H, H2, J = 1,7 Hz).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$, 25°C) : δ = 45,57 (C7), 53,33 (C8), 124,93 (C2), 126,19 (C4), 146,93 (C3), 148,60 (C1), 158,61 (C5) 164,31 (C6).

HRMS (ESI+) : 219,9926 ; calculé pour [C8H8Cl2NO2] : 219,9927.

3.4.3 Synthèse de $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$

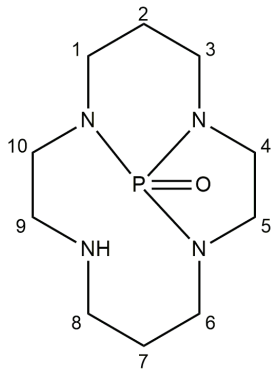



CO2Me
N
Cl
N
N
P=O
N
N
N
7
MeO
O
NH2
Pd(AcO)2, xantphos
dioxane
90 ºC, 90 h
54 %
H
N
CO2Me
O
OMe
8
HCl
reflux, 48 h
60 %
NH
HN
CO2H
9
CuCl2,
K2CO3, H2O
80 ºC, 2 h
25 ºC, 24 h
14 %
Cu2+
CO2 Θ
10

(6)

Oxyde de décahydro-1H-2a,5a,8,11a-tétraaza-2a1-phosphacyclonona[cd]indène2a1 ; cyclam-PO

($C_{10}H_{21}N_4OP$)



Pour la synthèse de ce produit, nous avons adapté le protocole proposé par Filali et collaborateurs (Filali *et al.*, 1991). Dans un ballon tricol sous azote, le cyclam (2,0 g, 9,98 mmol, 1 eq) est mis en solution dans le toluène (300 ml). La tris(diméthylamino)phosphine (1,8 ml, 10 mmol, 1 eq) est ajoutée lentement à température ambiante. La sortie du gaz du montage est connectée à un bulleur, ce qui nous permet de contrôler la réaction. On observe la formation de diméthylamine gazeuse avec un papier de pH mouillé avec de l'eau mis au niveau de la sortie du bulleur car il devient vert par réaction avec cette base. Le mélange réactionnel est chauffé au reflux jusqu'à la disparition du changement de couleur (14 jours). Après refroidissement de la solution jusqu'à température ambiante, le tétrachlorure de carbone (30 ml) est ajouté. Le solvant est évaporé sous vide et le résidu est repris dans de l'hydroxyde de sodium 1 M (20 ml). La phase aqueuse est extraite avec du chloroforme (3 x 50 ml). Les phases organiques réunies sont séchées sur sulfate de magnésium, et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est repris dans l'acétonitrile (15 ml). La formation d'un précipité blanc correspondant au produit de départ (cyclam) est observée, qui est ensuite filtré. Si aucun précipité ne se forme, le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est mis en solution dans aussi peu de dichlorométhane que possible, et ensuite un volume quinze fois supérieur d'hexane est ajouté. La formation

d'un précipité est observée. Le précipité est ensuite filtré et séché sous vide pour obtenir le cyclam-PO sous forme d'une huile jaune (359 mg, 1,47 mmol, 15 %).

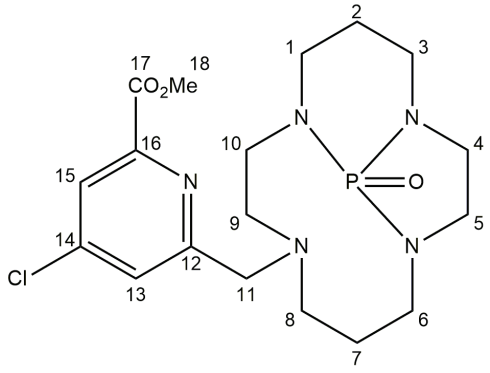
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25°C) : δ = 1,46 (m, 1H, H2 ou H7), 1,59 (m, 1H, H2 ou H7), 1,72 (m, 1H, H2 ou H7), 1,85 (m, 1H, H2 ou H7), 2,50 – 2,75 (m, 6H, H1, H3, H4, H5, H6, H8, H9 ou H10), 2,75 – 3,10 (m, 6H, H1, H3, H4, H5, H6, H8, H9 ou H10), 3,15 – 3,30 (m, 2H, H1, H3, H4, H5, H6, H8, H9 ou H10), 3,60 – 3,75 (m, 2H, H1, H3, H4, H5, H6, H8, H9 ou H10).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$, 25°C) : δ = 22,05, 28,01 (C2 ou C7), 42,04, 43,03, 44,47, 44,58, 45,91, 46,52, 46,64, 50,71 (C1, C3, C4, C5, C6, C8, C9 ou C10).

^{31}P NMR (162 MHz, $CDCl_3$, 25°C) : δ = 26,23 (PO).

(7)

4-chloro-6-((2a1-oxidohexahydro-1H-2a,5a,8,11a-tetraaza-2a1-phosphacyclonona[cd]indèn-8(2H,3H,9H)-yl)méthyl)picolinate de méthyle ;
cyclam-PO-chloropicolinate
($C_{18}H_{27}ClN_5O_3P$)



Le cyclam-PO **(6)** (400 mg, 1,64 mmol, 1 eq) est mis en solution dans l'acétonitrile (10 ml) sous atmosphère d'azote. Le carbonate de potassium (1,133 g, 8,2 mmol, 5 eq) est introduit par petites portions à température ambiante. Ensuite, une solution de 4-chloro-6-(chlorométhyl)picolinate de méthyle **(5)** (361 mg, 1,64 mmol, 1 eq) dans l'acétonitrile (10 ml) est ajoutée goutte à goutte. Le mélange réactionnel est chauffé à 40 °C pendant une nuit. La suspension est refroidie jusqu'à température ambiante. Le

précipité est filtré et le solvant du filtrat est évaporé sous vide. Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : chloroforme / méthanol 95 : 5). On obtient le cyclam-PO-chloropicolinate sous forme d'une huile jaune (0,423 mg, 0,99 mmol, 60 %).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25°C) : δ = 1,52 (br s, 2H, H2 ou H7), 1,72 (m, 1H, H2 ou H7), 1,82 (m, 1H, H2 ou H7), 2,27 (m, 1H, H1, H3, H4, H5, H6, H8, H9 ou H10), 2,45 – 2,70 (m, 5H, H1, H3, H4, H5, H6, H8, H9 ou H10), 2,75 – 3,07 (m, 4H, H1, H3, H4, H5, H6, H8, H9 ou H10), 3,13 (m, 1H, H1, H3, H4, H5, H6, H8, H9 ou H10), 3,29 (m, 3H, H1, H3, H4, H5, H6, H8, H9 ou H10), 3,58 (m, 1H, H1, H3, H4, H5, H6, H8, H9 ou H10), 3,74 (m, 1H, H1, H3, H4, H5, H6, H8, H9 ou H10), 3,72 (d, 1H, H11, J = 16 Hz), 3,90 (d, 1H, H11, J = 16 Hz), 3,92 (s, 3H, H18), 7,91 (s, 1H, H13), 8,47 (s, 1H, H15).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$, 25°C) : δ = 22,04, 26,64 (C2 ou C7), 41,18, 42,03, 42,36, 44,56, 46,01, 51,66, 53,07, 53,97 (C1, C3, C4, C5, C6, C8, C9 ou C10), 53,12 (C18), 60,13 (C11), 124,26 (C15), 126,99 (C13), 146,56 (C14), 148,06 (C16), 162,83 (C12) 164,94 (C17).

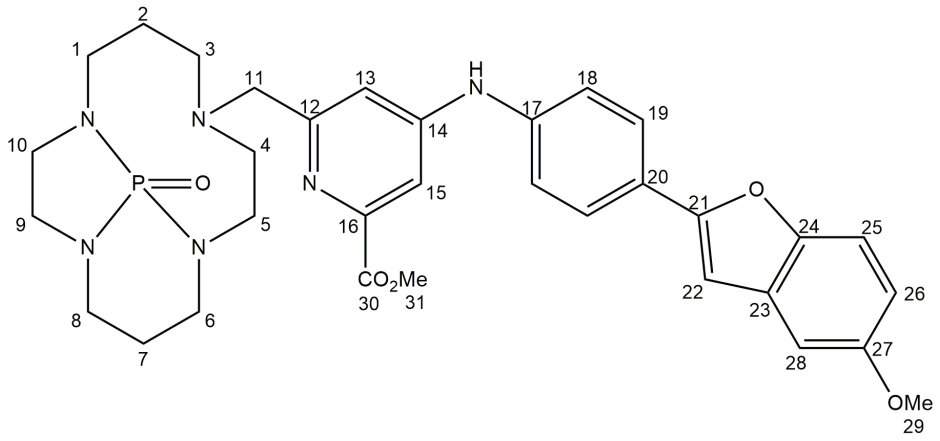
^{31}P NMR (162 MHz, $CDCl_3$, 25°C) : δ = 25,55 (PO).

HRMS (ESI+) : 428,1612 ; calculé pour [$C_{18}H_{28}ClN_5O_3P$] : 428,1613.

(8)

4-((4-(5-méthoxybenzofuran-2-yl)phényl)amino)-6-((2a1-oxidohexahydro-1H-2a,5a,8,11a-tétraaza-2a1-phosphacyclonona[cd]inden-8(2H,3H,9H)-yl)-méthyl)picolinate de méthyle ; cyclam-PO-picolinate-ONO

($C_{33}H_{39}N_6O_5P$)



Le xantphos (68 mg, 0,118 mmol, 0,25 eq) et l'acétate de palladium(II) (15 mg, 0,067 mmol, 0,14 eq) sont mis en suspension dans le dioxanne (5 ml) sous argon. Le mélange est agité pendant 10 minutes à température ambiante pour former le catalyseur. L'ONO **(2)** (154,0 mg, 0,643 mmol, 1,3 eq), le cyclam-PO-chloropicolinate **(7)** (205,5 mg, 0,480 mmol, 1 eq) et le carbonate de césium (630,0 mg, 3,26 mmol, 6,8 eq) sont introduits par petites portions à température ambiante. Le mélange réactionnel est agité à 95 °C pendant trois jours. La formation d'un précipité noir est observée. Après refroidissement de la suspension à température ambiante, le dichlorométhane (15 ml) est ajouté et l'ensemble est agité pendant 5 minutes. Le précipité est filtré et lavé avec du dichlorométhane (15 ml). Le solvant du filtrat est évaporé sous vide. Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : dichlorométhane / méthanol 98 : 2). On obtient le cyclam-PO-picolinate-ONO sous forme d'une huile marron (160,4 mg, 0,259 mmol, 54 %).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25°C) : δ = 1,59 (m, 2H, H2 ou H7), 1,81 (m, 1H, H2 ou H7), 1,90 (m, 1H, H2 ou H7), 2,36 (m, 1H, H1, H3, H4, H5, H6, H8, H9 ou

H10), 2,55 – 2,75 (m, 5H, H1, H3, H4, H5, H6, H8, H9 ou H10), 2,85 – 3,25 (m, 5H, H1, H3, H4, H5, H6, H8, H9 ou H10), 3,37 (m, 3H, H1, H3, H4, H5, H6, H8, H9 ou H10), 3,58 (m, 1H, H1, H3, H4, H5, H6, H8, H9 ou H10), 3,67 (m, 1H, H1, H3, H4, H5, H6, H8, H9 ou H10), 3,65 (d, 1H, H11, J = 15,7 Hz), 3,90 (d, 1H, H11, J = 15,7 Hz), 3,86 (s, 3H, H29), 3,94 (s, 3H, H31), 6,87 (d, 1H, H26, J = 9 Hz), 6,88 (s, 1H, H28), 7,03 (s, 1H, H22), 7,30 (d, 2H, H18, J = 8,4 Hz), 7,39 (d, 1H, H25, J = 9 Hz), 7,80 (d, 2H, H19, J = 8,4 Hz), 7,84 (s, 1H, H13), 7,96 (s, 1H, H15).

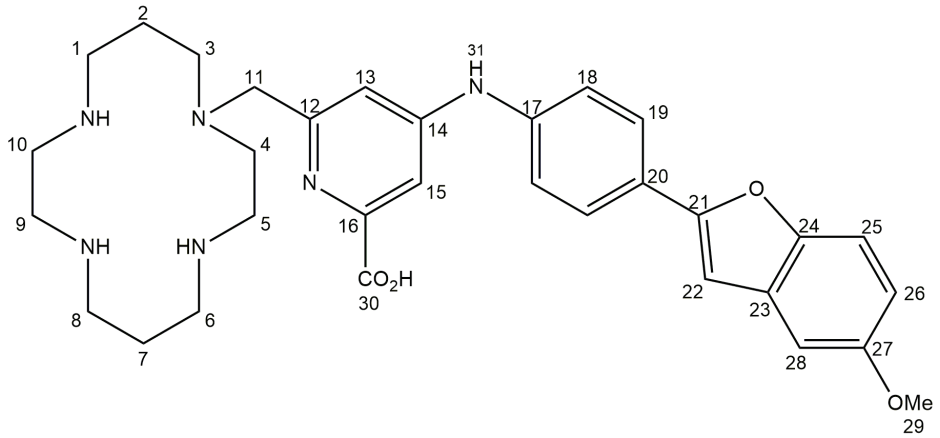
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$, 25°C) : δ = 22,03, 26,67 (C2 ou C7), 41,09, 42,06, 42,41, 44,60, 45,94, 52,10, 53,34, 54,22 (C1, C3, C4, C5, C6, C8, C9 ou C10), 52,87 (C29), 55,92 (C31), 60,56 (C11), 100,46 (C22), 103,18 (C28), 107,73 (C15), 111,46 (C25), 112,54 (C26), 113,59 (C13), 120,75 (C18), 126,02 (C19), 125,42 (C20), 129,99 (C23), 140,49 (C17), 148,24 (C24), 149,81 (C16), 151,95 (C27), 156,02 (C12), 156,70 (C21), 161,64 (C14), 166,47 (C30).

^{31}P NMR (162 MHz, $CDCl_3$, 25°C) : δ = 25,20 (PO).

HRMS (ESI+) : 631,2785 ; calculé pour [$C_{33}H_{40}N_6O_5P$] : 631,2792.

(9)

Acide 6-((1,4,8,11-tétraazacyclotétradécan-1-yl)méthyl)-4-((4-(5-méthoxybenzofuran-2-yl)phényl)amino)picolinique ; te1pa-ONO ($C_{32}H_{40}N_6O_4$)



Le cyclam-PO-picolinate-ONO **(8)** (32 mg, 0,051 mmol, 1 eq) est mis en solution dans le HCl 6 M (10 ml). La solution est chauffée au reflux pendant 2 jours. La formation d'un précipité marron est observée. Après refroidissement de la suspension à température ambiante, le précipité est filtré puis séché sous vide. Le précipité est repris dans l'eau (10 ml). La solution est chauffée au reflux pendant une nuit. Après refroidissement de la suspension à température ambiante, le solvant est évaporé sous vide. On obtient le te1pa-ONO sous forme de solide marron. La pureté est vérifiée par HPLC analytique (27 mg, 0,047 mmol, 93 %).

^{1}H NMR (400 MHz, D_2O, 50°C) : δ = 1,93 (m, 2H, H2 ou H7), 2,26 (m, 2H, H2 ou H7), 2,56 (m, 2H, H1, H3, H4, H5, H6, H8, H9 ou H10), 2,88 (m, 2H, H1, H3, H4, H5, H6, H8, H9 ou H10), 3,19 (m, 2H, H1, H3, H4, H5, H6, H8, H9 ou H10), 3,30 (m, 6H, H1, H3, H4, H5, H6, H8, H9 ou H10), 3,56 (m, 4H, H1, H3, H4, H5, H6, H8, H9 ou H10), 3,63 (s, 3H, H29), 3,70 (s, 2H, H11), 6,55 (s, 1H, H22), 6,65 (d, 1H, H26, J = 7,5 Hz), 6,69 (s, 1H, H13), 6,80 (s, 1H, H15), 7,00 (d, 2H, H18, J = 8 Hz), 7,08 (d, 1H, H25, J = 7,5 Hz), 7,15 (s, 1H, H28), 7,36 (d, 2H, H19, J = 8 Hz).

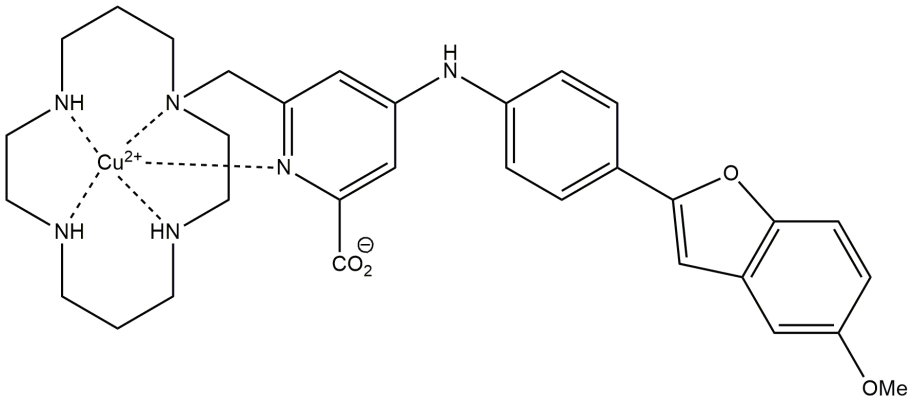
^{13}C NMR (101 MHz, D_2O, 25°C) : δ = 22,70, 24,70 (C2 ou C7), 41,60, 42,36, 44,72, 45,16, 45,68 (C1, C5, C6, C8, C9, C10), 50,55, 52,65 (C3, C4), 56,67 (C11), 58,48 (C29), 104,78, 106,12 (C15, C22, C28), 114,25, 115,60 (C13, C25, C26) 125,04, 128,37 (C18, C19), 130,06, 132,12, 139,31, 151,81, 157,75, 157,95, 158,71 (C12, C14, C16, C17, C20, C21, C24, C25, C27), 166,47 (C30).

MS (ESI+) : 573,35 ; calculé pour [$C_{32}H_{41}N_6O_4$] : 573,32.

(10)

[Cu(te1pa-ONO)]Cl

($CuC_{32}H_{39}N_6O_4Cl$)



Le chlorure de cuivre (16,7 mg, 0,045 mmol, 1 eq) et le te1pa-ONO **(9)** (27 mg, 0,047 mmol, 1,05 eq) sont mis en solution dans l'eau (4 ml). Le pH est ensuite ajusté à 7 avec du carbonate de potassium. La solution est chauffée à 80 °C pendant 2 heures, ensuite agitée à température ambiante pendant 24 heures. Le précipité est filtré et lavé avec l'eau (2 ml). Le solvant du filtrat est séché sous vide. On obtient le [Cu(te1pa-ONO)] sous forme d'un solide marron (4 mg, 0,0063 mmol, 14 %).

HRMS (ESI+) : 634,2321 ; calculé pour [$CuC_{32}H_{39}N_6O_4$] : 634,2323.

3.5 Les lignées cellulaires K562 et K562/ADR

La lignée cellulaire K562 est une lignée érythrolymphoblastique de cellules faiblement différentiées dérivée d'une patiente de 53 ans atteinte de leucémie myéloïde chronique en crise blastique (Lozzio et Lozzio, 1975). Les cellules sont arrondies et se développent en suspension sans montrer adhérence aux parois du flacon. Nous avons utilisé deux types de cette lignée cellulaire : la lignée K562 (Lozzio et Lozzio, 1975) et la lignée K562/ADR (Tsuruo *et al*., 1986). Ces deux lignées nous ont été fournies par le Dr. Ruoping Tang (Hôpital de l'Hôtel Dieu, Paris, France).

La lignée résistante K562/ADR surexprime la protéine P-gp, ce qui lui confère une résistance contre certains médicaments y compris les anthracyclines utilisées dans le traitement chimiothérapeutique de certains types de cancer. La P-gp est une protéine membranaire qui transporte ces agents chimiques vers l'extérieur de la cellule, empêchant leur accumulation intracellulaire et ainsi leur activité. En comparant les deux lignées cellulaires il est alors possible d'établir l'influence de la P-gp sur le transport intracellulaire d'une molécule.

Les cellules K562 et K562/ADR ont été cultivées dans le milieu RPMI 1640 Glutamax (Gibco) supplémenté avec 10 % de sérum de veau nouveau-né décomplémenté (Gibco) et avec 0,1 g/l d'un mélange de pénicilline et streptomycine (Gibco), dans un incubateur humidifié avec 5 % de CO_2 à 37 °C. Le sérum de veau nouveau-né a été décomplémenté préalablement dans un bain marie à 56 °C pendant 30 minutes.

Les cellules ensemencées à 10^5 cellules/ml, se multiplient exponentiellement jusqu'à environ 10^6 cellules/ml après 3 jours. La veille de l'expérience, les cellules sont ensemencées à une concentration de 5 x 10^5 cellules/ml afin d'avoir des cellules en phase de croissance exponentielle lors de la manipulation. Avant leur utilisation les cellules sont comptées à l'aide du compteur de cellules.

La surexpression de la P-gp est maintenue dans la lignée K562/ADR par un traitement, toutes les 4 semaines, avec de la doxorubicine à une concentration finale de 400 nM. Les niveaux d'expression de P-gp ont été vérifiés avant de toute expérience, avec la mesure des paramètres d'efflux de la pirarubicine (Reungpatthanaphong *et al.*, 2004 ; Darghal *et al.*, 2010). Lors des expériences, la viabilité des cellules a été évaluée avec le test du bleu de trypan, et elle a toujours été supérieure au 95 %.

3.6 La lignée cellulaire SH-SY5Y

La lignée cellulaire SH-SY5Y est une lignée de neuroblastome d'origine humaine qui est utilisée pour des études de neurobiologie car ces cellules sont représentatives de celles du SNC (Xie *et al*., 2010). Cette lignée cellulaire a été utilisée afin d'évaluer la cytotoxicité de l'ONO et du $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$ sur les cellules neuronales dans le cadre d'une éventuelle utilisation intracerebrale de ces deux composés.

Ces cellules adhérentes ont été cultivées dans un milieu de culture composé en proportions égales de Minimum Essential Medium MEM (Sigma-Aldrich) et de Nutrient Mixture F-12 HAM (Sigma-Aldrich), supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté (Gibco), 2 mM de L-glutamine (Sigma-Aldrich) et 1 % v/v de pénicilline-streptomycine (Gibco), dans un incubateur humidifié avec 5 % de CO_2 à 37 °C.

3.7 Tests de viabilité cellulaire avec le bleu de trypan

La viabilité des cellules a été évaluée avec le test d'exclusion du bleu de trypan (Pappenheimer, 1917) afin de nous assurer de l'absence de toxicité sur les cellules pendant les expériences de fluorescence et d'incorporation cellulaire des molécules étudiées. 10 µl de la suspension de cellules sont mélangés avec 10 µl d'une solution 0,1 % de bleu de trypan sur une cellule de Malassez et les cellules sont ensuite comptées au microscope. Les cellules mortes sont colorées en bleu, car leur membrane est devenue perméable au bleu de trypan. Le pourcentage de cellules mortes est ensuite calculé. Les cellules sont considérées viables quand ce pourcentage reste inférieur à 5 %.

3.8 Etude du transport de la pirarubicine par la P-gp.

Les anthracyclines sont une famille de médicaments utilisés en chimiothérapie pour le traitement de divers types de cancer. Les anthracyclines s'intercalent entre les paires de bases de l'ADN produisant un effet antimitotique. Ces molécules sont

fluorescentes. Leur entrée dans les cellules est suivie par leur accumulation dans le noyau et leur intercalation entre les paires de bases de l'ADN, ce qui provoque une extinction de leur signal de fluorescence. Cette propriété nous permet de suivre son incorporation en fonction du temps par spectrofluorimétrie (Frezard et Garnier-Suillerot, 1991).

La pirarubicine (4'-o-tetrahydropyranyl-adriamycin) est une anthracycline qui est un substrat connu de la P-gp (**Figure 17**). La mesure de la variation du signal de fluorescence de la pirarubicine en fonction du temps nous permet d'étudier le transport des anthracyclines par la P-gp dans des cellules vivantes. La variation d'intensité de fluorescence au maximum d'émission à 590 nm (λ_{exc} = 480 nm) a été enregistrée en fonction du temps (Frezard et Garnier-Suillerot, 1991).

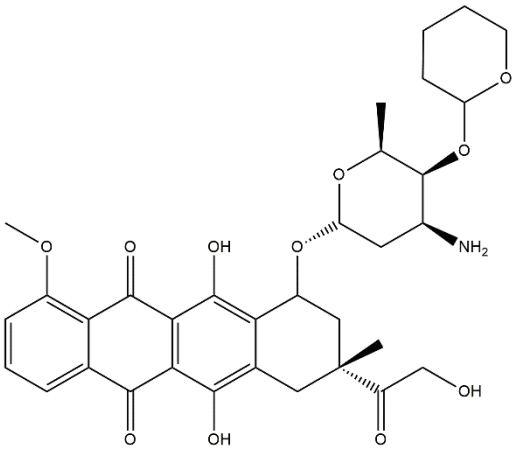


Figure 17 : Structure de la pirarubicine.

Le jour de l'expérience, des aliquotes de la solution mère de pirarubicine sont dilués avec de l'eau pour obtenir une concentration de 2 x 10^{-4} M. Les cellules sont mises en suspension dans le tampon HEPES/Na^+ à une concentration de 10^6 cellules/ml, et 5 mM de glucose est additionné. La cuve de quartz contenant les cellules, de 1 cm² de section, est placée à 37 °C sous agitation dans le compartiment

du spectrofluorimètre, et l'intensité de fluorescence (F) à 590 nm (λ_{exc} = 480 nm) est alors enregistrée.

Au temps t = 0, l'addition à la suspension cellulaire d'une concentration finale (C_T) de 1 µM de pirarubicine entraîne l'augmentation du signal jusqu'à un maximum (F_0). Le signal décroît comme résultat de l'accumulation de la pirarubicine à l'intérieur des cellules, et atteint un état stationnaire (F_n) qui est mesuré 30 minutes après l'ajout de la pirarubicine. La concentration de pirarubicine intercalée dans le noyau (C_n) peut être déterminée par l'équation suivante :

$$C_n = C_T \cdot \frac{(F_0 - F_n)}{F_0} \quad [4]$$

Le triton X-100 est un composé tensioactif utilisé pour perméabiliser les membranes cellulaires. L'addition d'une concentration finale de 0,02 % masse/volume de triton X-100 amène à un état d'équilibre (F_N). La concentration de pirarubicine intercalée (C_N) est, dans ce cas :

$$C_N = C_T \cdot \frac{(F_0 - F_N)}{F_0} \quad [5]$$

La comparaison de l'incorporation de pirarubicine dans les cellules K562 et K562/ADR montre que ces dernières incorporent moins de pirarubicine que les cellules K562, et que c'est seulement après l'ajout du triton X-100 que le taux de pirarubicine incorporée devient équivalent pour les deux lignées cellulaires. Cette différence d'accumulation s'explique par une modification au niveau de son transport membranaire et plus spécialement par son efflux par la P-gp (Frezard et Garnier-Suillerot, 1991 ; Marbeuf-Gueye *et al.*, 2000).

3.9 Etude de l'inhibition de la P-gp

Pour étudier l'effet d'une série d'inhibiteurs sur l'activité de transport de la P-gp, nous avons étudié la modification du transport de la pirarubicine par cette protéine en présence de différents inhibiteurs. Ainsi, les cellules ont été incubées comme indiqué précédemment, mais cette fois-ci en présence de différentes concentrations de l'inhibiteur à tester. Lorsqu'une concentration d'inhibiteur (C_I) comprise entre 0 et 5 µM est ajoutée, une diminution plus importante du signal fluorescent est observée comparée au témoin où les cellules sont incubées sans inhibiteur. Cette diminution est d'autant plus importante que C_I est élevé. L'inhibiteur a été ajouté une minute avant l'ajout de la pirarubicine.

Par rapport à l'expérience témoin, sans ajout d'inhibiteur, nous définissons la fraction d'inhibition α comme :

$$\alpha_i = \frac{Cn_i - Cn_{contrôle}}{CN_i - Cn_{contrôle}} \quad [6]$$

Les valeurs de α peuvent varier entre 0, où aucun effet inhibiteur n'est détecté, et 1, où l'inhibition est complète. Des valeurs de $\alpha > 1$ ont été ajustées à $\alpha = 1$. Les valeurs de α ont été calculées pour les différentes concentrations d'un inhibiteur I, et la concentration donnant 50 % d'inhibition (c'est-à-dire, celle correspondant à $\alpha = 0{,}5$) a été déterminée pour chaque composé.

Les valeurs de α obtenus ont été représentées graphiquement en fonction de la concentration finale d'inhibiteur additionné et ajustés à un modèle non-linéaire (Saengkhae, 2004). Les paramètres a et b nous permettent de modéliser le comportement inhibiteur de la P-gp d'un composé.

$$\alpha = a\left(1 - e^{-(b \cdot [inhibiteur])}\right) \quad [7]$$

3.10 Tests de cytotoxicité des complexes métalliques et de l'ONO.

3.10.1 Tests de cytotoxicité : évaluation de la croissance cellulaire des cellules K562 et K562/ADR

Nous avons étudié la cytotoxicité des complexes macrocycliques $[Cu(te1pa)]^+$ et $[Eu(do2pa)]^+$ et le marqueur des plaques amyloïdes ONO en mesurant leur effet sur la croissance cellulaire des cellules K562 et K562/ADR. La concentration des cellules après 72 heures en présence ($C_{molécule}$), ou en absence ($C_{témoin}$) de la molécule à tester est représentée en fonction de la concentration de la molécule testée. Ces valeurs, ainsi que la concentration initiale des cellules (C_0), permettent de déterminer le pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire (% CI), ainsi que le CI_{50} correspondant à la concentration inhibant le 50 % de la croissance cellulaire.

$$\% CI = \frac{C_{témoin} - C_{molécule}}{C_{témoin} - C_0} \quad [8]$$

Les cellules K562 et K562/ADR ont été mises en culture dans des plaques de 96 puits à une concentration initiale (C_0) de 10^5 cellules/ml dans un volume de 200 µl, en présence de concentrations entre 0 à 500 µM de la molécule à tester. Après 72 heures, les cellules ont été observées au microscope et comptées avec le compteur Coulter.

3.10.2 Tests de cytotoxicité dans des cellules SH-SY5Y

La cytotoxicité de l'ONO et du complexe $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$ sur la lignée cellulaire SH-SY5Y a été étudiée par la mesure de la viabilité cellulaire et l'évaluation de la croissance cellulaire en présence de deux composés. La viabilité cellulaire a été évaluée par l'incorporation de l'iodure de propidium (IP) (**Figure 18**) dans les cellules neuronales.

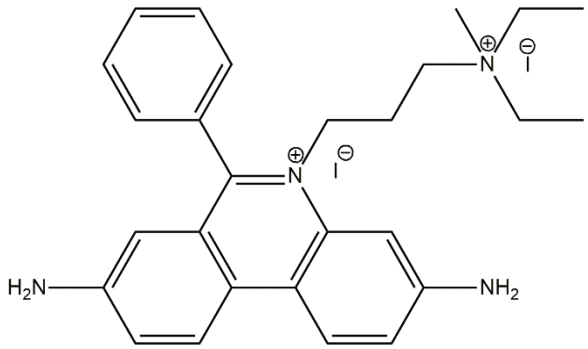


Figure 18 : Structure de l'iodure de propidium

Cette molécule fluorescente s'intercale entre les paires de bases de l'ADN, ce qui entraîne une augmentation de l'intensité de fluorescence. Etant une molécule relativement hydrophile, l'IP ne traverse pas la membrane plasmique. Ainsi, il ne pénètre pas dans les cellules viables dont l'intégrité membranaire est mantenue, tandis que dans les cellules mortes avec la membrane perméabilisée l'IP peut pénétrer dans les cellules.

Concernant l'étude de la cytotoxicité par l'évaluation de la modification de la croissance cellulaire en présence de composés d'intérêt, les cellules SH-SY5Y ont été ensemencées dans des plaques de 96 puits à une concentration initiale (C_0) de 2 x 10^5 cellules/ml dans un volume de 100 µl. Des solutions de l'ONO et du [Cu(te1pa-ONO)]$^+$ ont été préparées à une concentration finale de 0,1 mM dans le DMSO. Cette concentration a été ajoutée aux cellules comme la concentration la plus élevée, à partir de laquelle des dilutions en série 1 : 2 ont été réalisées. Des cellules traitées avec la même quantité de DMSO ont été évaluées en parallèle comme témoin. Après 72 heures et le traitement avec trypsine, les cellules ont été incubées pendant 5 minutes, à température ambiante et à l'abri de la lumière, avec 0,1 mg/ml d'IP, et ensuite le nombre de cellules et la viabilité cellulaire ont été analysés par cytométrie de flux.

3.11 Dosage de la concentration d'Eu^{3+} libre

La concentration d'Eu^{3+} libre dans les complexes d'europium a été mesurée par une méthode colorimétrique utilisant l'arsénazo III (**Figure 19**) (2,7-bis (acide o-arsénophénylazo)-1,8-dihydroxynaphthalène-3,6-disulfonique), un ligand qui forme avec Eu^{3+} un complexe stable mais qui n'est pas capable de déplacer les ligands macrocycliques (Hvattum *et al.*, 1995 ; Barge *et al.*, 2006). Lorsqu'on ajoute l'arsénazo III, ce ligand complexe Eu^{3+} libre présent dans la solution (Uhrovčík *et al.*, 2013). L'arsénazo III montre un pic d'absorption à 540 nm, et lors de sa complexation avec Eu^{3+} il donne lieu à de nouveaux pics à 610 nm et 650 nm. Nous avons utilisé ce dernier pic pour le dosage d'Eu^{3+} libre.

Une gamme d'étalonnage est réalisée dans des cuves de quartz de 2 ml avec des concentrations croissantes d'$EuCl_3$ entre 0 µM et 8 µM et d'arsénazo III à une concentration finale de 15 µM dans un tampon d'acide acétique 0,3 % ajusté à pH = 5,8 (Barge *et al.*, 2006). Les spectres d'absorption ont été enregistrés et les valeurs maximales d'absorbance à 650 nm ont été déterminées et présentées en fonction de la concentration d'Eu^{3+}.

Cette gamme d'étalonnage nous sert pour la détermination de la concentration d'Eu^{3+} libre dans une solution de complexe d'europium à partir de la valeur de l'absorbance de l'arsénazo III à 650 nm en présence d'une concentration finale de 40 µM du complexe d'europium dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la gamme d'étalonnage.

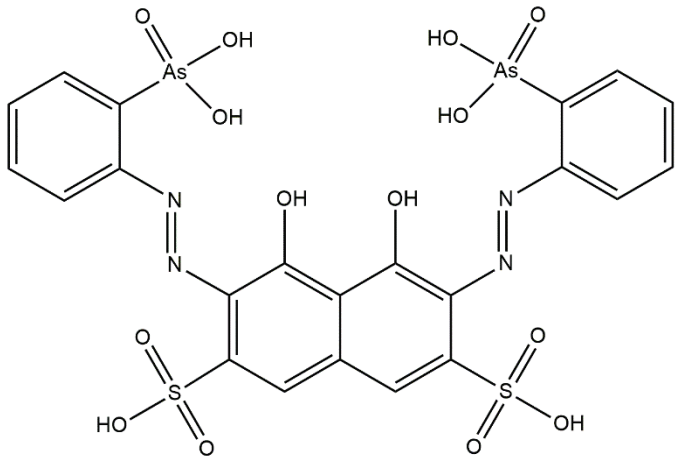


Figure 19 : Structure de l'arsénazo III.

3.12 Incorporation des complexes métalliques dans les cellules.

Les cellules (10^6 cellules/ml) sont incubées à 37°C dans le tampon HEPES/Na+ contenant 5 mM de glucose sous agitation constante (100 rpm) dans un bain. Le début de la cinétique d'incubation est marqué par l'ajout de 100 µM du complexe métallique à étudier. Au temps zéro (t = 0) et après des intervalles de temps fixés, 1 ml de la suspension cellulaire (soit 10^6 cellules) est prélevé et centrifugé 30 secondes afin de séparer le culot cellulaire du surnageant. Les surnageants sont gardés à 4°C jusqu'à leur dosage par SAA le lendemain. Les culots sont lavés deux fois avec du tampon HEPES/Na^+ froid, puis mis à incuber pendant une nuit à 4 °C dans 300 µl d'acide nitrique 65 %. Le lendemain, les culots sont complétés avec de l'eau jusqu'à 1 ml de volume final et gardés à 4 °C jusqu'à leur dosage par SAA (**Figure 20**).

La concentration de cuivre et d'europium dans chaque échantillon a été mesurée par SAA après avoir réalisé une gamme d'étalonnage à partir de des solutions mères d'$EuCl_3$ ou de $Cu(ClO_4)_2$ dans un intervalle entre 0 et 1 µM pour l'europium et entre 0 et 0,4 µM pour le cuivre. La gamme est réalisée dans les mêmes conditions que celles des échantillons, c'est-à-dire, dans de l'eau contenant 30 % d'acide nitrique 65 %. La concentration de métaux mesurée dans les culots digérés correspond à la concentration

intracellulaire (Ci), et celle des surnageants correspond à la concentration extracellulaire (Ce).

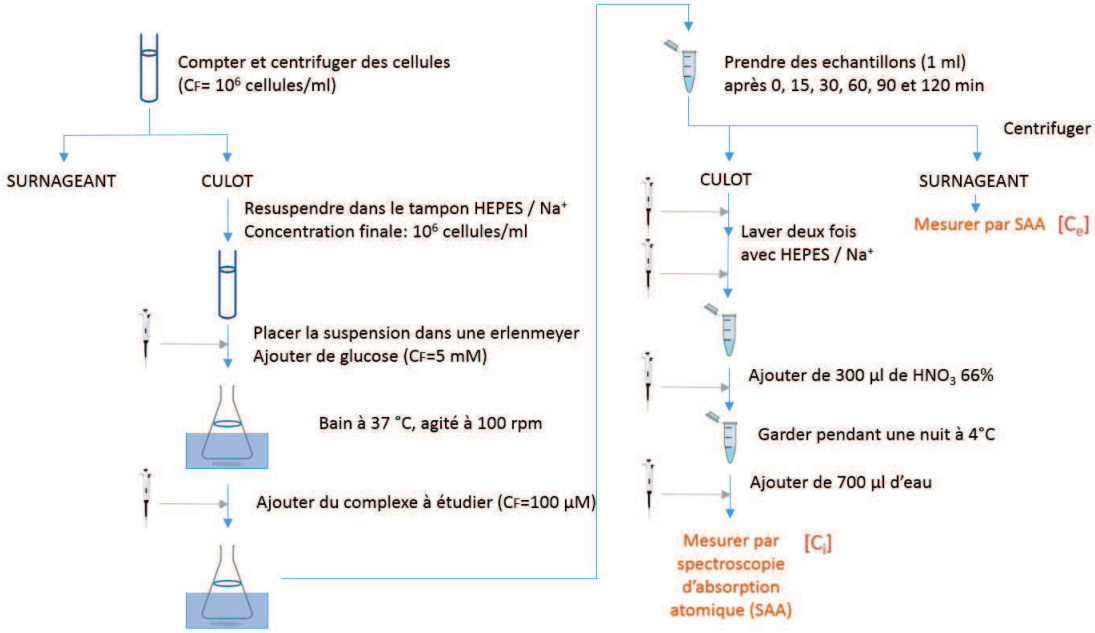


Figure 20 : Protocole des expériences d'incorporation de complexes métalliques dans les cellules.

3.13 Evaluation de l'élimination du potentiel mitochondrial par le FCCP

La tétraméthylrosamine (TMR) (**Figure 21**) est un xanthène fluorescente chargé positivement qui s'accumule dans la mitochondrie et ainsi permet d'évaluer l'effet du FCCP sur l'élimination du potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\psi_{mit}$).

Les cellules à une concentration de 10^6 cellules/ml dans du tampon HEPES/Na^+ avec 5 mM de glucose sont placées dans une cuve de quartz de 1 cm² de section. Cette cuve est placée à 37 °C sous agitation dans le compartiment du spectrofluorimètre. L'intensité de fluorescence est enregistrée à 575 nm (λ_{exc} = 543 nm). Les fentes d'entrée et sortie ont été réglées à 5 µm.

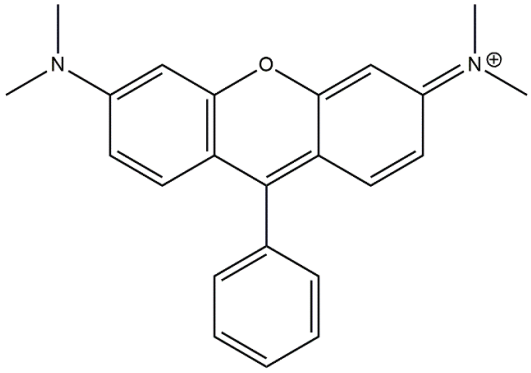


Figure 21 : Structure de la tétraméthylrosamine

L'addition d'une concentration finale de 0,5 µM de TMR entraîne l'augmentation rapide du signal fluorescente. Progressivement, le signal diminue jusqu'à atteindre un état stationnaire provoqué par l'accumulation de la TMR à l'intérieur des cellules, essentiellement dans les mitochondries, sous l'effet des gradients de potentiels membranaires : celui de la membrane plasmique $\Delta\psi_{mbr}$ et celui de la membrane mitochondriale $\Delta\psi_{mit.}$ Dans ces conditions, les deux potentiels sont négatifs ($\Delta\psi_{mbr} < 0$; $\Delta\psi_{mit} < 0$), favorisant l'accumulation de molécules avec une charge positive.

A l'état stationnaire, 1 µM de FCCP est ajouté afin d'éliminer le potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\psi_{mbr} < 0$; $\Delta\psi_{mit} = 0$), ce qui entraîne une augmentation de l'intensité de fluorescence de la TMR. Cette augmentation de la fluorescence peut être interprétée par le fait qu'en présence de FCCP le $\Delta\psi_{mit}$ est dissipé et la TMR ne s'accumule plus dans les mitochondries.

3.14 Incorporation de l'ONO dans les cellules

Les cellules K562 et K562/ADR (10^6 cellules/ml) ont été incubées, à 37 °C, dans le tampon HEPES/Na^+ contenant 5 mM de glucose. Au temps zéro, 20 µM d'ONO ont été ajoutés et le signal fluorescent (F_{cyto}) enregistré en cytométrie de flux. L'autofluorescence des cellules a été également mesurée avant l'ajout de l'ONO et elle a été soustraite de la valeur de fluorescence obtenue pour chaque point.

Chapitre 4.
Incorporation intracellulaire des complexes [Eu(do2pa)]$^{+}$ et [Cu(te1pa)]$^{+}$

«Hay que reírse cuando dicen que la ciencia fracasa.
Lo que fracasa es la mentira; la ciencia marcha adelante.»
Il faut rire quand on dit que la science échoue.
Tout ce qui échoue est le mensonge ; la science avance.

Pío Baroja, El árbol de la ciencia

4.1 Importance du transport intracellulaire

Le transport intracellulaire est un facteur important à considérer dans le cadre du développement de molécules utilisables en imagerie médicale. La capacité de traverser la membrane plasmique permettrait d'utiliser ces molécules pour visualiser des processus ayant lieu à l'intérieur des cellules (Hao *et al.,* 2011).

Comme il a été mentionné dans le chapitre 2, la BHE apparaît comme l'obstacle le plus difficile à surmonter pour l'utilisation des agents d'imagerie visant le peptide Aβ *in vivo*. L'entrée au cerveau requiert le passage des cellules qui constituent la BHE. Les études d'incorporation cellulaire permettent ainsi de mieux comprendre les mécanismes de transport intracellulaire qui seraient nécessaires pour l'entrée de ces composés dans le cerveau humain. Cependant, la prise en compte de cet aspect est souvent limitée dans la littérature.

Les transporteurs de la famille ABC présents au niveau de la BHE ont un fort impact sur l'incorporation dans le cerveau de certaines molécules. La P-gp est le transporteur le plus étudié de cette famille, car ce protéine est impliquée dans la résistance multiple aux médicaments (*multi-drug resistance*, ou MDR). L'activité de la P-gp diminue la concentration intracellulaire de ses substrats, car elle les transporte unidirectionnellement vers l'extérieur de la cellule.

Dans ce chapitre nous décrivons l'étude des propriétés d'incorporation intracellulaire et de cytotoxicité du complexe d'europium $[Eu(do2pa)]^+$, analogue du complexe de gadolinium $[Gd(do2pa)]^+$, qui serait utilisable comme agent de contraste pour l'IRM (Rodríguez-Rodríguez *et al.,* 2012), et du complexe de cuivre $[Cu(te1pa)]^+$, dont la complexation avec des différents isotopes de cuivre donnerait lieu au développement de molécules radioactives utilisables en TEP (Lima *et al.,* 2012).

4.2 Les tétraazamacrocycles

Les tétraazamacrocycles sont composés par quatre amines intégrées dans un cycle d'atomes de carbone saturés. Ils sont capables de complexer spécifiquement avec une très forte stabilité divers métaux de transition comme le cuivre, le manganèse, le nickel, ou des lanthanides comme l'europium ou le gadolinium. Le pouvoir complexant de ces composés s'explique par le fait que les amines sont, selon le concept acide-base de Pearson, des bases ni trop dures ni trop molles, ce qui leur permet d'interagir efficacement avec une grande variété de métaux (Roger, 2013). De plus, l'effet macrocyclique proportionne à ces molécules une inertie cinétique et une stabilité thermodynamique extrêmement élevée, permettant d'éviter la perte du métal lors de leur utilisation dans le corps humain.

La protection du macrocycle, la fonctionnalisation avec le bras d'intérêt, puis une déprotection finale permettent d'obtenir des dérivés sélectifs des tétraazamacrocycles. Ainsi, des nouveaux ligands peuvent être produits, dont les paramètres de complexation métallique peuvent être modulés. Des bases de Lewis comme des amines, des phosphines, ou des carboxylates, peuvent se lier avec le cation lorsqu'elles sont introduites dans les bras fonctionnalisant le cycle. Il convient de tenir en compte les propriétés d'acide dur ou mou du métal pour introduire des bases avec l'affinité correspondante.

Par exemple, le Gd^{3+} a un comportement d'acide dur selon le concept acide-base de Pearson, à cause de sa charge élevée. Le ligand dota est un dérivé du cyclen avec quatre bras carboxyle N-fonctionnalisés. Ces bras carboxylates agissent comme des bases dures et se lient très efficacement au Gd^{3+}. La contribution du groupe carboxylate à la sphère de coordination du lanthanide augmente fortement la stabilité du dota en comparaison avec le cyclen (Roger, 2013).

L'insertion de différents bras permettant la fonctionnalisation des tétraazamacrocycles permet aussi d'envisager l'introduction au squelette macrocyclique de structures d'intérêt pour une utilisation biologique ou médicale.

Les travaux de Rodríguez-Rodríguez et collaborateurs (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2012) et de Lima et collaborateurs (Lima *et al.*, 2012) décrivent la synthèse et la caractérisation chimique des complexes de Ln^{3+} et Cu^{2+} respectivement, avec des ligands tétraazamacrocycliques (cyclam et cyclen) N-fonctionnalisés avec des groupes picolinates.

Ces travaux ont donné lieu aux complexes $[Gd(do2pa)]^{+}$ et $[Cu(te1pa)]^{+}$, qui pourraient être des bons candidats pour son utilisation en imagerie médicale pour les raisons suivantes (Lima *et al.*, 2012 ; Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2012) :

1. Ils ont une stabilité thermodynamique et électrochimique, similaire à celle des complexes approuvés pour l'utilisation clinique.
2. Ils ont une inertie cinétique appropriée pour l'usage *in vivo*.
3. Ils ne sont pas toxiques.
4. Ils sont facilement dérivables.
5. Ils ont des propriétés chimiques qui les rendent efficaces dans le contexte des techniques d'imagerie, notamment la relaxivité du $[Gd(do2pa)]^{+}$, similaire à celle des agents de contraste commerciaux (Zhou et Lu, 2013) ou la rapide vitesse de complexation du $[Cu(te1pa)]^{+}$.

4.3 Le complexe $[Eu(do2pa)]^{+}$

Le ligand do2pa est un dérivé du cyclen avec deux bras picolinates situés sur les azotes des positions 1 et 7. Dans les complexes de forme $[Ln(do2pa)]^{+}$, l'atome métallique est attaché au ligand par les quatre amines du cyclen, par l'azote des pyridines et par les groupes carboxyles des deux groupes picolinate (**Figure 22**). Le do2pa agit comme un ligand octadentate (**Figure 23**) (Lima *et al.*, 2012 ; Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2012).

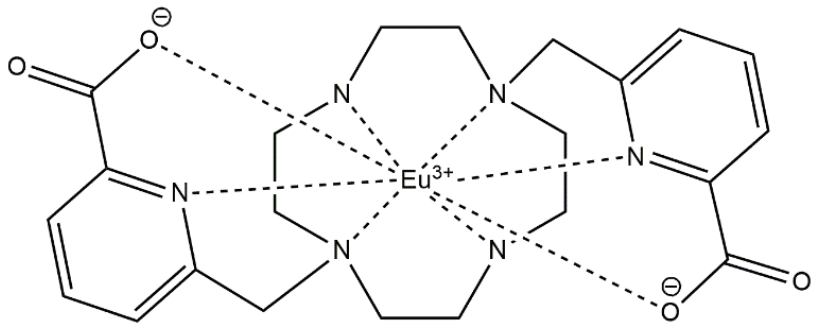


Figure 22 : Structure de l'[Eu(do2pa)]$^{+}$.

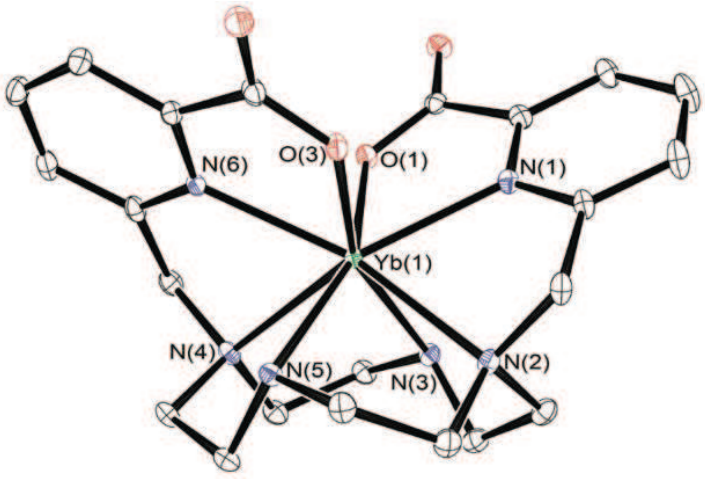


Figure 23 : Structure tridimensionnelle du [Yb(do2pa)]$^{+}$ comme analogue de l'[Eu(do2pa)]$^{+}$ obtenue par diffraction de rayons X. Reproduit de (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2012) avec la permission de American Chemical Society.

Dans les chélates de Gd^{3+}, plusieurs électrons non appariés produisent un moment magnétique très fort qui, pendant l'acquisition de l'image d'IRM, modifie le temps de relaxation des molécules d'eau situées dans la sphère interne de coordination du complexe et celles situées dans la sphère externe. Le taux d'échange des molécules d'eau qui entrent et sortent de ces sphères est lié à l'efficacité de l'agent de contraste, et est en relation directe avec les caractéristiques physicochimiques de l'environnement du métal.

Une molécule d'eau peut pénétrer dans la sphère interne du complexe $[Gd(do2pa)]^+$. L'intéraction directe de cette molécule avec l'ion paramagnétique améliore la relaxivité du complexe. Le $[Gd(do2pa)]^+$ a une relaxivité de 2,8 mM^{-1} s^{-1}, une valeur comparable à celle des agents de contraste commerciaux (Zhou et Lu, 2013), permettant son utilisation comme agent de contraste pour l'IRM (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2012). Le complexe $[Gd(do2pa)]^+$ présente une vitesse d'échange d'eau plus de dix fois supérieure à celle de $[Gd(dota)]^-$ (Rodríguez-Rodríguez *et al.,* 2012). Il est intéressant de noter que ce ligand peut être aussi utilisé pour complexer des autres ions d'intérêt médicale tels que le Cu^{2+} ou le Mn^{2+} (Rodríguez-Rodríguez *et al.,* 2015).

Compte tenu de l'impossibilité de mesurer la concentration de gadolinium avec le matériel disponible dans notre laboratoire, nous avons utilisé pour nos expériences un analogue des agents de contraste à base de Gd^{3+}, le complexe $[Eu(do2pa)]^+$. Les lanthanides europium et gadolinium sont voisins dans le tableau périodique. Ils montrent des propriétés chimiques très similaires, parmi elles la valence, la réactivité chimique ou le rayon ionique (94,7 pm pour l'Eu^{3+}, 93,8 pm pour le Gd^{3+}), ce qui permet leur utilisation comme analogues échangeables (Crich *et al*., 2004 ; Darghal *et al*., 2010).

4.4 Le complexe $[Cu(te1pa)]^+$

Le ligand te1pa est un dérivé du cyclam N-fonctionnalisé avec un seul bras picolinate (**Figure 24**). Ce ligand pentadentate se lie à l'ion Cu^{2+} par l'intermédiaire des quatre amines du cyclam et par le groupe amine du picolinate. Le groupe carboxyle du picolinate peut contribuer à la stabilité du complexe en formant une liaison hydrogène avec l'amine en position opposée (**Figure 25**). *In vivo*, $[^{64}Cu(te1pa)]^+$ est très résistant à la transmétallation, non-toxique, et il est éliminé du foie et des reins après 24 heures (Frindel *et al.,* 2014).

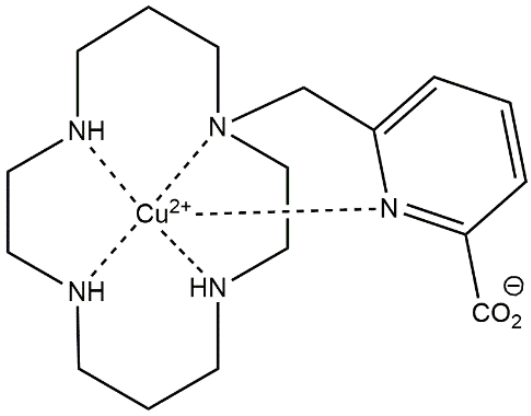


Figure 24 : Structure du [Cu(te1pa)]$^{+}$

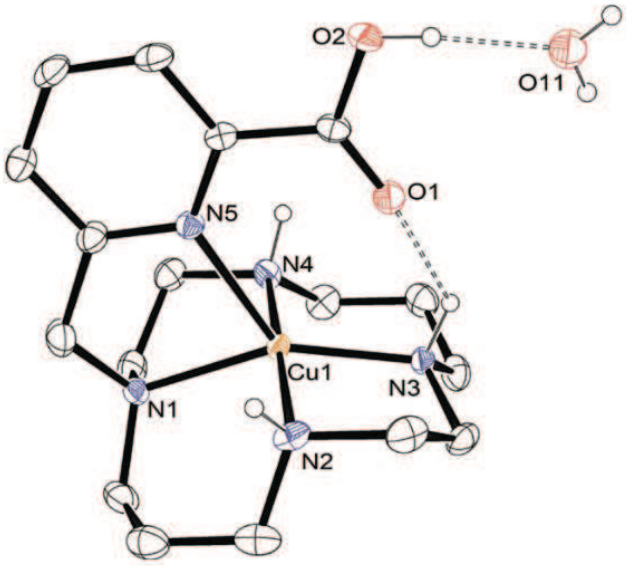


Figure 25 : Structure tridimensionnelle du [Cu(te1pa)]$^{+}$ obtenue par diffraction de rayons X. Reproduit de (Lima *et al.*, 2012) avec la permission de American Chemical Society.

La désintégration radioactive des radioisotopes du ^{64}Cu exige une complexation rapide du métal. Un temps de réaction court est nécessaire afin d'éviter la perte d'activité avant l'administration des composés aux patients. La formation de [^{64}Cu(te1pa)]$^{+}$ est quantitative à température ambiante après un temps de réaction de seulement 15 minutes (Frindel *et al.,* 2014).

Pour éviter la transmétallation du cuivre radioactif *in vivo*, il faut considérer que l'ion Cu^{2+} peut se réduire à Cu^{+} dans les conditions de pH et température du milieu physiologique. Le changement de la géométrie de coordination entre les deux états d'oxydation du cuivre amène potentiellement à une perte de stabilité. Des expériences de voltammétrie cyclique en solution aqueuse montrent que le $[Cu(te1pa)]^{+}$ est stable quand le métal est réduit à Cu^{+} à pH neutre (Lima *et al.,* 2012).

Contrairement à des autres tetraazamacrocycles comme le cyclen, la taille de la cavité du cyclam n'est pas appropriée pour la complexation d'ions Ln^{3+}. On trouve dans la littérature des exemples de complexes de cyclam avec des bras renforçant la liaison avec le métal, mais ces complexes n'ont pas une stabilité suffisante pour l'utilisation médicale (Liang et Sadler, 2004 ; Lima *et al.*, 2010 ; Pillai *et al.*, 2013). En conclusion, le cyclam n'est pas approprié pour la production d'agents de contraste pour l'IRM.

4.5 Stabilité thermodynamique et cinétique

L'affinité du ligand vers le métal est un des paramètres les plus importants du point de vue de l'utilisation clinique des complexes métalliques. Elle peut être considérée du point de vue de la stabilité thermodynamique, mais aussi du point de vue de l'inertie cinétique. Bien que la stabilité thermodynamique soit le paramètre le plus étudié, il faut remarquer que l'inertie cinétique est un meilleur indicateur de la décomplexation des agents de contraste *in vivo* (Idée *et al.,* 2009).

La stabilité thermodynamique d'un chélate métallique (Idée *et al.*, 2009) est une mesure de l'équilibre entre un métal (M), son ligand (L), et le chélate (ML) comme:

$$M + L \leftrightarrows ML \qquad [9]$$

La constante de stabilité de ce système, K_{ML}, est obtenue après l'application de la loi d'action de masse, comme :

$$K_{ML} = [ML] / ([M] \times [L]) \qquad [10]$$

Les valeurs de pM ($-\log [M]_{libre}$), obtenues à pH = 7,4, sont une mesure précise de la stabilité thermodynamique des complexes métalliques, car ils prennent en considération la basicité du ligand et les constantes de stabilité K_{ML}. Elles décrivent l'équilibre entre le métal et le ligand au pH physiologique. Les valeurs de pM des complexes étudiés sont similaires à des autres complexes trouvés dans la littérature, comme on peut voir dans le **Tableau 4** :

Tableau 4 : Valeurs de pM (pCu ou pGd) des complexes étudiés, et d'autres complexes macrocycliques, comme mesure de la stabilité thermodynamique. Ces valeurs ont été calculés à pH = 7,4 avec $[Gd^{3+}]_{totale} = 10^{-5}$ M et un excès de 100 % du ligand (Cacheris *et al.*, 1990 ; Xu *et al.*, 1995 ; Werner *et al.*, 2008 ; Lima *et al.*, 2012 ; Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2014).

	pCu
$[Cu(te1pa)]^+$	18,6
$[Cu(dota)]^{2-}$	15,8
$[Cu(cyclam)]^{2+}$	21,4
$[Cu(cyclen)]^{2+}$	18,0
[Cu(do2pa)]	15,8

	pGd
$[Gd(do2pa)]^+$	10,8
[Gd(do3a)]	14,9
$[Gd(dota)]^-$	17,6
$[Gd(dtpa)]^{2-}$	18,2
$[Gd(dtpa\text{-}bma)]^{2-}$	14,9

On peut observer que $[Cu(te1pa)]^+$ a une valeur de pCu supérieure à celle du $[Cu(dota)]^{2-}$, ce qui suggère une plus grande stabilité (Kotek *et al.,* 2003 ; Rodríguez-Rodríguez *et al.,* 2015). Il faut remarquer que le complexe $[Cu(dota)]^{2-}$ montre une tendance à se décomplexer *in vivo* (Frindel *et al.,* 2014).

Le complexe $[Gd(do2pa)]^+$ a une stabilité thermodynamique inférieure à celle d'autres complexes macrocycliques (Rodríguez-Rodríguez *et al.,* 2015). La forte stabilité de [Gd(do3a)] et $[Gd(dota)]^-$ s'explique par les bras carboxylates de ces composés, bases fortes selon le concept acide-base de Pearson, qui permettent la complexation de Gd^{3+}, acide fort, de façon très efficace. Le dota a un bras carboxylate de plus que le do3a, ce qui fait que le complexe $[Gd(dota)]^-$ est plus stable que $[Gd(dota)]^-$ (**Figure 26**). La stabilité thermodynamique de $[Gd(do2pa)]^+$ est plus proche de celle des bisamides linéaires formant des complexes neutres utilisés comme des agents de contraste commerciales, comme le $[Gd(dtpa\text{-}bma)]^{2-}$.

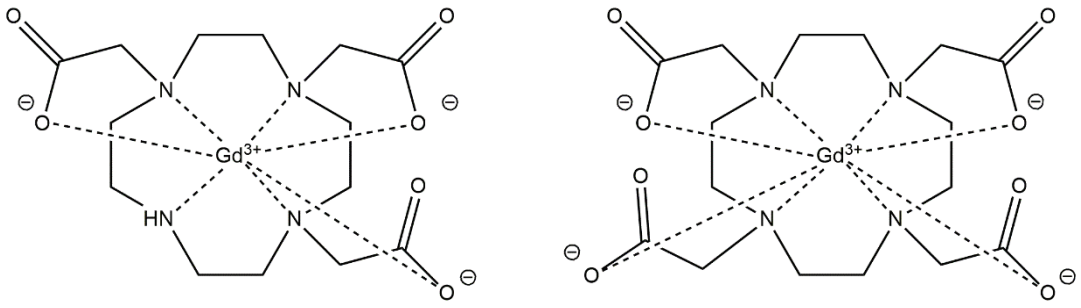


Figure 26 : Structure des complexes [Gd(do3a)] (gauche) et $[Gd(dota)]^-$ (droite).

L'inertie cinétique des complexes décrit la vitesse de dissociation du chélate métallique. Elle est souvent exprimée par la demi-vie du complexe, c'est-à-dire, le temps nécessaire pour que la moitié du complexe soit dissociée.

En général, la décomplexation de ce type de ligands est extrêmement lente à pH physiologique, mais peut être plus rapide dans des solutions acides. L'utilisation de pH acides permet la mesure et la comparaison des demi-vies des complexes. La demi-vie de $[Gd(do2pa)]^+$, de $[Cu(te1pa)]^+$, et celle d'autres composés trouvés dans la littérature, est présentée dans le **Tableau 5**. L'inertie cinétique de $[Gd(do2pa)]^+$ est comparable à celle des autres agents de contraste commerciaux, bien qu'il faille noter qu'elle est inférieure à celle de $[Gd(dota)]^-$.

Tableau 5 : Demi-vie en milieu acide comme mesure de l'inertie cinétique de différents complexes de gadolinium (25 ºC, 1 M HCl) et cuivre (25 ºC, 5 M $HClO_4$, sauf [Cu(do3a)]$^{-}$: 25 ºC, 1 M HNO_3) (Kotek *et al.,* 2003 ; Morcos, 2008 ; Rodríguez-Rodríguez *et al.,* 2012 ; Ševčík *et al.,* 2014).

	$t_{1/2}$
[Gd(do2pa)]$^{+}$	11 min
[Gd(dtpa-bma)]$^{-}$	35 s
[Gd(do3a)]	5 min
[Gd(dtpa)]$^{2-}$	10 min
[Gd(hp-do3a)]	3 h
[Gd(dota)]$^{-}$	45 jours

	$t_{1/2}$
[Cu(te1pa)]$^{+}$	2,5 h
[Cu(cyclam)]$^{2+}$	21 min
[Cu(cyclen)]$^{2+}$	10 min
[Cu(do3a)]$^{-}$	3 h
[Cu(dota)]$^{2-}$	28 h

4.6 Etude de l'incorporation intracellulaire d'[Eu(do2pa)]$^{+}$ et [Cu(te1pa)]$^{+}$ et leur cytotoxicité

L'utilisation de ces complexes pour le développement d'agents d'imagerie intracellulaire ou pour le développement de molécules capables de détecter le peptide Aβ *in vivo* requiert l'étude de leur toxicité, de leur transport intracellulaire, et de leur interaction avec la P-gp en tant qu'éventuels substrats.

Nous avons étudié par SAA la cinétique d'incorporation, dans des cellules K562 et K562/ADR, des complexes [Eu(do2pa)]$^{+}$ et [Cu(te1pa)]$^{+}$, ainsi que celle des deux ions métalliques non complexés. La comparaison des cinétiques de transport dans les cellules K562 et les cellules K562/ADR, qui surexpriment la P-gp, permet d'évaluer si les complexes sont des substrats de cette protéine.

Nous avons comparé l'incorporation intracellulaire des complexes [Eu(do2pa)]$^{+}$ et [Cu(te1pa)]$^{+}$ à celle d'[Eu(dota)]$^{-}$, analogue de l'agent de contraste [Gd(dota)]$^{-}$, commercialisé avec le nom de Dotarem® (Guerbet) (**Figure 26**). Ce complexe est l'agent de contraste macrocyclique le plus utilisé en clinique, avec des ventes globales

de plus de 200 millions d'euros annuelles. Le $[Gd(dota)]^-$, comme la plupart des agents de contraste commerciaux, a été conçu dans le but d'une utilisation extracellulaire.

Comme mentionné précédemment, la grande stabilité de $[Gd(dota)]^-$ et son efficacité comme agent de contraste en termes de relaxivité ont amené à son utilisation comme base pour la production d'agents de contraste pour la détection du peptide Aβ (Caravan *et al.,* 1999 ; Pierre *et al.,* 2014). En général, ces molécules sont capables de détecter les plaques amyloïdes mais incapables de traverser la BHE (Poduslo *et al.*, 2002 ; Wadghiri *et al.*, 2003 ; Martins *et al.*, 2013, 2014, 2015 ; Bort *et al.*, 2014 ; Watanabe *et al.*, 2014).

L'incorporation des métaux libres Eu^{3+} et Cu^{2+} a été étudiée comme témoin à partir des produits de départ pour les synthèses des composés, $EuCl_3$ et $Cu(ClO_4)_2$. L'incorporation intracellulaire a été étudiée à une concentration de 100 μM de métal dans les conditions habituelles, afin de mieux comprendre les effets d'une éventuelle interférence des ions libres lors des mesures faites avec les complexes.

Les potentiels de membrane existants dans la cellule peuvent avoir un effet sur la distribution intracellulaire de médicaments, particulièrement ceux chargés positivement. Les potentiels membranaires qui pourraient avoir plus d'influence dans cette distribution intracellulaire sont celui de la membrane plasmique $\Delta\psi_{mbr}$ et celui de la membrane mitochondriale $\Delta\psi_{mit}$. Tous les deux sont des potentiels négatifs (Perry *et al.*, 2011 ; Rowinska-Zyrek *et al.*, 2015). Ainsi, nous avons étudié l'effet de la dépolarisation de la membrane mitochondriale sur l'accumulation intracellulaire d'$[Eu(do2pa)]^+$ et de l'ion Eu^{3+} afin d'évaluer si le complexe et la forme non complexée d'europium pouvaient s'accumuler dans la cellule.

Le carbonylcyanure-4-(trifluorométhoxy)phénylhydrazone (FCCP) est un ionophore qui dépolarise la membrane mitochondriale (Tretter *et al.,* 1998 ; Smith *et al.,* 1999). Dans cette étude, il a été utilisé pour évaluer si $[Eu(do2pa)]^+$ et Eu^{3+}, chargés positivement, s'accumulent dans les mitochondries compte tenu du potentiel de

membrane $\Delta\psi_{mit}$ négatif. Si c'est le cas, l'élimination du $\Delta\psi_{mit}$ devrait occasionner une réduction de l'accumulation moléculaire dans la cellule.

L'ajout du FCCP pour dépolariser la membrane mitochondriale dans les expériences a été réalisé à une concentration finale de 1 µM, une minute avant d'ajouter l'$[Eu(do2pa)]^+$ ou l'Eu^{3+} libre. L'efficacité du FCCP dans le cadre de l'élimination du $\Delta\psi_{mit}$ a été contrôlée par spectrofluorimétrie en utilisant tétraméthylrosamine (TMR).

Finalement, nous avons aussi réalisé des tests de cytotoxicité sur les cellules K562 et K562/ADR pour les complexes $[Eu(do2pa)]^+$ et $[Cu(te1pa)]^+$ à des concentrations comprises entre 0 à 500 µM. Le nombre de cellules a été normalisé à 100 %. Dans tous les cas, au moins trois expériences indépendantes ont été réalisées sur trois jours différents.

4.7 Résultats et discussion

Les valeurs de Ci/Ce et de Ci à 120 min sont résumées dans le **Tableau 6**. Les valeurs montrent la moyenne ± écart type d'au moins trois expériences indépendantes réalisées sur trois jours différents. La signification statistique a été déterminée avec le test t de Student.

Tableau 6 : Concentration intracellulaire d'europium ou cuivre (Ci) et rapport entre la concentration intracellulaire et extracellulaire (Ci/Ce) dans les cellules K562 et K562/ADR après 120 min.

[a] Ci/Ce = rapport de la concentration intracellulaire de métal (Ci) par rapport à la concentration extracellulaire de métal (Ce) à 120 min.

[b] Ci_{120} = accumulation intracellulaire à 120 min.

Complexe	Cellules	Ci/Ce[a]	Ci_{120} (mM) [b]
Eu^{3+}	K562	300 ± 40	17 ± 4
	K562/ADR	300 ± 60	16 ± 1
	K562 FCCP	300 ± 60	16 ± 1
Cu^{2+}	K562	<1	<0,001
	K562/ADR	<1	<0,001
$[Eu(dota)]^-$	K562	<1	<0,001
	K562/ADR	<1	<0,001
$[Eu(do2pa)]^+$	K562	5 ± 2	0,51 ± 0,16
	K562/ADR	5 ± 1	0,64 ± 0,18
	K562 FCCP	5,9 ± 0,2	0,63 ± 0,17
$[Cu(te1pa)]^+$	K562	1,3 ± 0,3	0,09 ± 0,02
	K562/ADR	1,5 ± 0,5	0,10 ± 0,03

4.7.1 [Eu(do2pa)]$^+$

Pour le complexe [Eu(do2pa)]$^+$, les tests de cytotoxicité montrent que la toxicité est négligeable par rapport au témoin ($p > 0,05$) entre 0 à 500 µM (**Figure 27**).

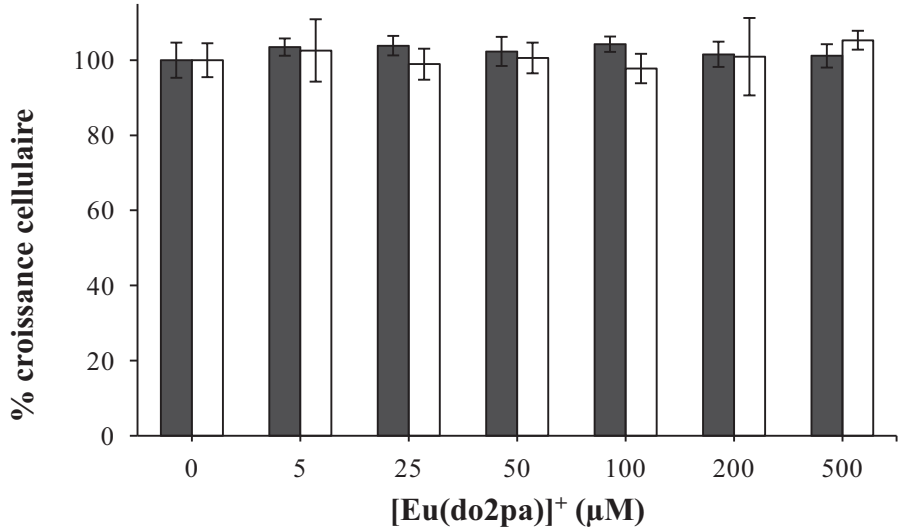


Figure 27 : Pourcentage de croissance cellulaire en fonction de la concentration d'[Eu(do2pa)]$^+$ pour les cellules K562 (barres blanches) et K562/ADR (barres grises).

Lors des expériences d'incorporation cellulaire (**Figure 28**), [Eu(do2pa)]$^+$ s'accumule à l'intérieur des cellules en fonction du temps jusqu'à atteindre d'un plateau après 120 min avec un rapport Ci/Ce de 5, ce qui suggère que ce complexe est capable d'entrer dans les cellules. De plus, on n'observe pas de différence entre les cellules K562 et les cellules K562/ADR. Ces résultats suggèrent que [Eu(do2pa)]$^+$ n'est pas un substrat de la P-gp.

Après avoir observé l'accumulation du complexe [Eu(do2pa)]$^+$, nous avons décidé d'étudier si ce composé pouvait s'accumuler dans la mitochondrie, en raison du potentiel de membrane négatif de cet organite. Cependant, aucun changement signifiant de l'incorporation intracellulaire du complexe n'est observé quand les cellules sont traitées avec du FCCP pour éliminer le potentiel de membrane mitochondriale.

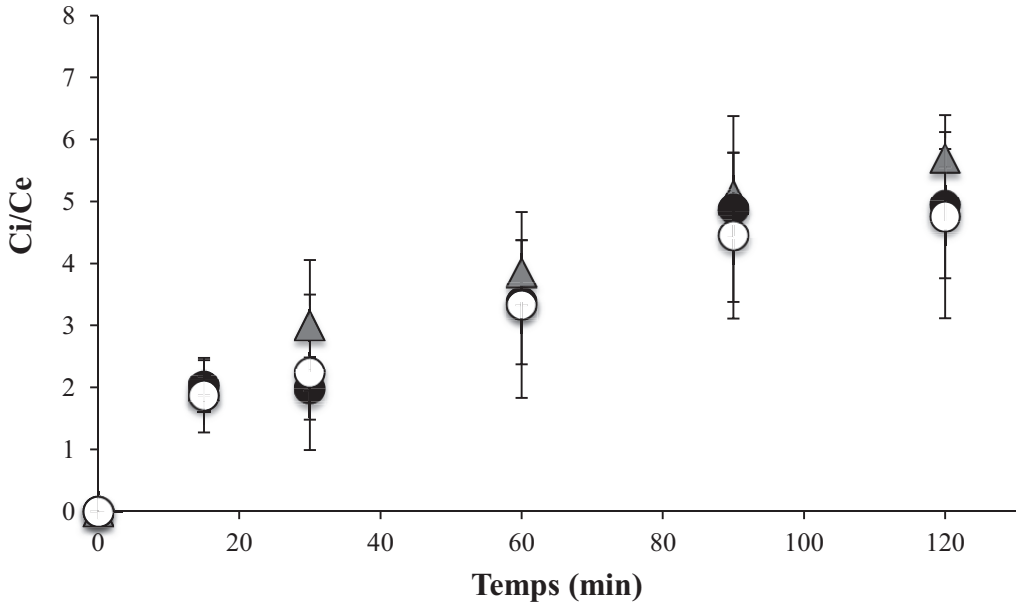


Figure 28 : Rapport entre la concentration intracellulaire (Ci) et la concentration extracellulaire (Ce) d'$[Eu(do2pa)]^+$ en fonction du temps pour les cellules K562 (cercles blancs), K562/ADR (cercles noirs), et K562 traitées avec FCCP (triangles gris).

4.7.2 $[Cu(te1pa)]^+$

En ce qui concerne $[Cu(te1pa)]^+$, une cytotoxicité faible, mais significative ($p < 0,05$) est observée à partir de 200 µM dans les deux lignées cellulaires (**Figure 29**). La croissance cellulaire des cellules traitées avec 500 µM de $[Cu(te1pa)]^+$ est réduite à approximativement 85 % de celle du contrôle.

L'accumulation intracellulaire de $[Cu(te1pa)]^+$ est moins importante que pour $[Eu(do2pa)]^+$, mais celle-ci change en fonction du temps avec un rapport Ci/Ce de 1,4 à 120 min (**Figure 30**). Ce résultat suggère que le complexe entre dans les cellules. En ce qui concerne l'effet de la P-gp sur le transport intracellulaire, là encore, nous n'avons pas observé de différence entre les deux lignées cellulaires étudiées.

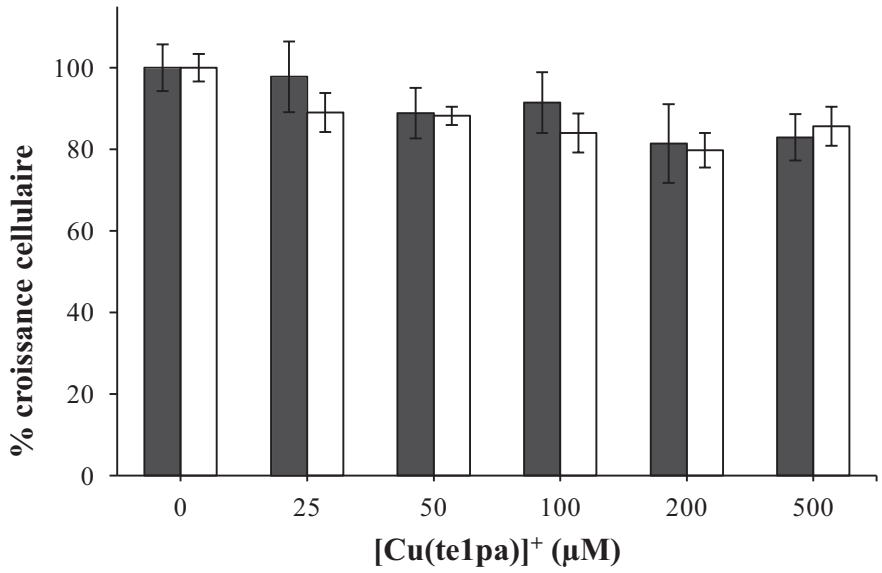


Figure 29 : Pourcentage de croissance cellulaire en fonction de la concentration de [Cu(te1pa)]$^{+}$ pour les cellules K562 (barres blanches) et K562/ADR (barres grises).

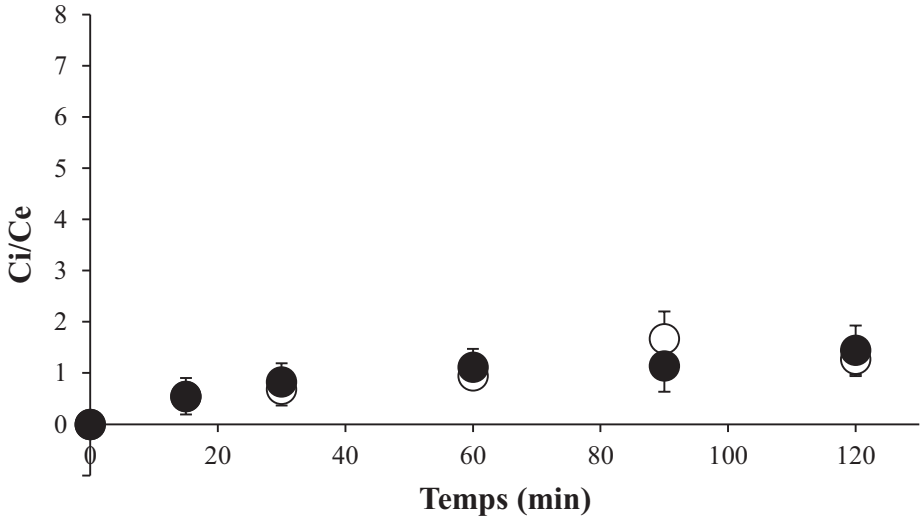


Figure 30 : Rapport entre la concentration intracellulaire (Ci) et la concentration extracellulaire (Ce) de [Cu(te1pa)]$^{+}$ en fonction du temps pour les cellules K562 (cercles blancs) et K562/ADR (cercles noirs).

4.7.3 Contrôles

Lors des expériences d'incorporation cellulaire réalisées avec $[Eu(dota)]^-$ nous n'avons pas observé d'incorporation du complexe, ni dans les cellules K562 ni dans les cellules K562/ADR (**Figure 31**).

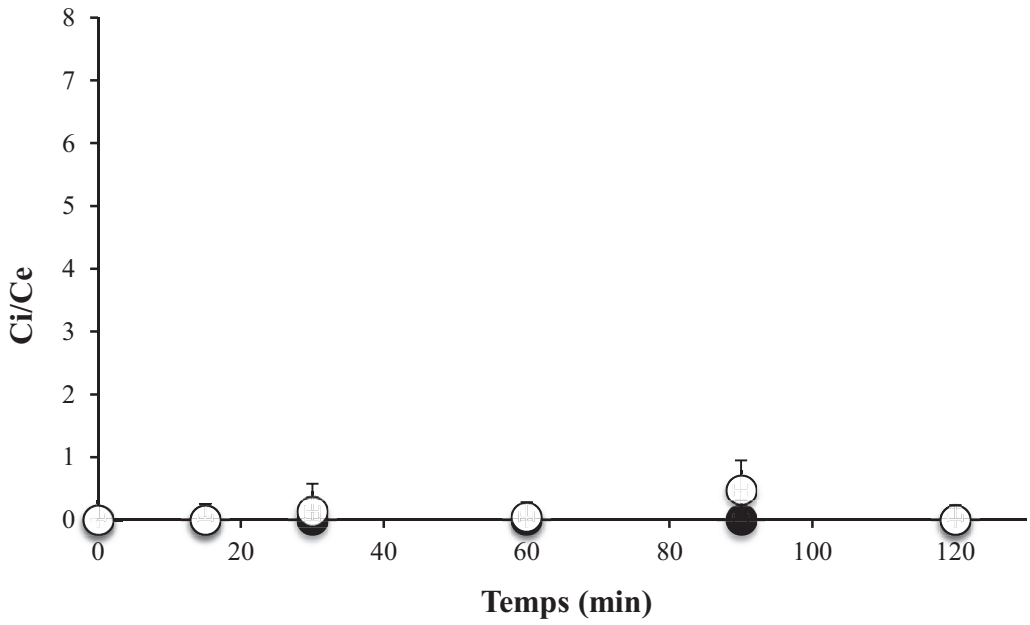


Figure 31 : Rapport entre la concentration intracellulaire (Ci) et la concentration extracellulaire (Ce) d'$[Eu(dota)]^-$ en fonction du temps pour les cellules K562 (cercles blancs) et K562/ADR (cercles noirs).

L'ion Eu^{3+} montre une très forte accumulation intracellulaire (**Figure 32**). Après deux heures, la concentration intracellulaire est presque 300 fois plus élevée que la concentration extracellulaire. L'addition de FCCP ne produit pas de changement significatif de l'incorporation. Cette accumulation montre l'importance de s'assurer de l'absence d'Eu^{3+} libre, ce que l'on a fait avec la méthode colorimétrique de l'Arsenazo III.

A la différence de l'ion Eu^{3+}, l'ion Cu^{2+} ne montre pas d'accumulation significative dans l'intervalle de temps étudié (**Figure 33**).

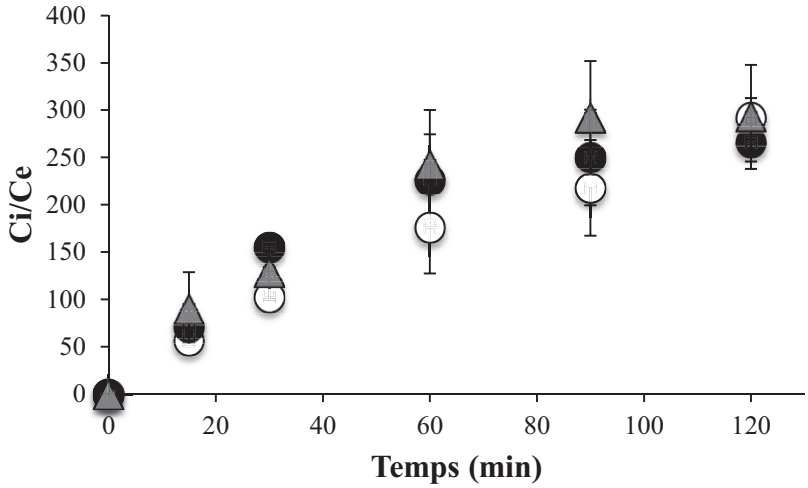


Figure 32 : Rapport entre la concentration intracellulaire (Ci) et la concentration extracellulaire (Ce) de l'ion Eu^{3+} en fonction du temps pour les cellules K562 (cercles blancs), K562/ADR (cercles noirs), et K562 traitées avec FCCP (triangles gris).

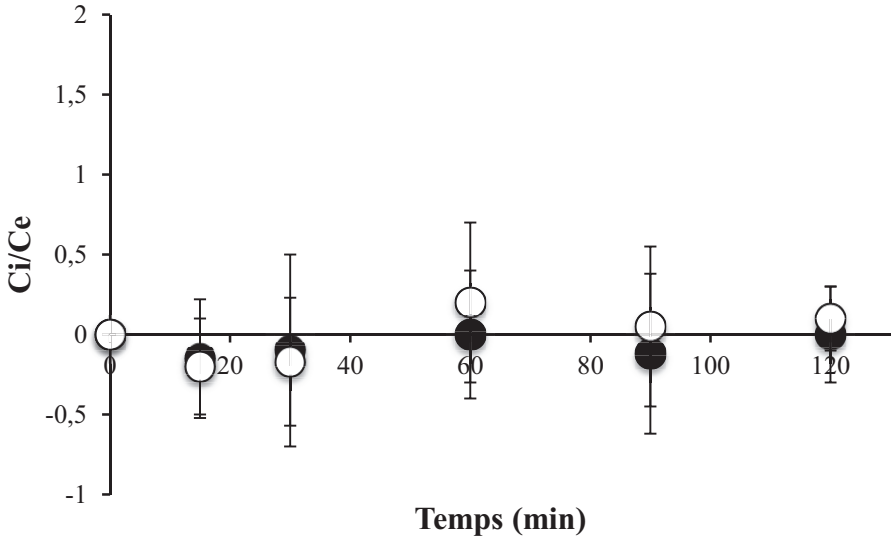


Figure 33 : Rapport entre la concentration intracellulaire (Ci) et la concentration extracellulaire (Ce) de l'ion Cu^{2+} en fonction du temps pour les cellules K562 (cercles blancs) et K562/ADR (cercles noirs).

4.8 Considérations sur la charge et la lipophilie

Comme nous l'avons vu précédemment, la structure de la BHE ne permet pas le transport paracellulaire, et par conséquent les molécules doivent suivre une voie transcellulaire pour pénétrer dans le cerveau, ce qui implique le passage de la membrane plasmique des cellules endothéliales de la BHE.

En général, l'entrée dans le SNC est plus efficace pour des molécules lipophiles, et aussi pour des molécules ayant un poids moléculaire faible (Gleeson, 2008). La présence d'une charge négative défavorise fortement l'entrée dans le SNC, tandis que les molécules chargées positivement ont un passage dans le SNC légèrement supérieur aux molécules neutres (Gleeson, 2008). Dans notre cas, les complexes $[Eu(do2pa)]^+$ et $[Cu(te1pa)]^+$ présentent une charge positive favorisant leur accumulation dans les cellules. Par contre, le complexe $[Eu(dota)]^-$ a une charge négative, ce qui pourrait expliquer le fait qu'il ne soit pas capable de s'incorporer dans les cellules.

L'utilisation de modèles informatiques permet d'évaluer de façon relativement facile plusieurs propriétés intéressantes pour l'utilisation clinique des molécules. Ces propriétés peuvent déterminer la biodistribution, l'activité et la sélectivité des candidats médicaments pour une utilisation chez l'humain (Lipinski *et al.,* 2001 ; Leeson, 2012). Cependant, les modèles *in silico* existants ayant été développés à partir de l'analyse de molécules purement organiques, ils ne sont pas nécessairement valides pour les complexes métalliques ou les molécules organométalliques (Meier *et al.,* 2013).

Bien qu'il ne soit pas possible de prédire les propriétés chimiques des complexes métalliques, l'évaluation *in silico* avec le logiciel QikProp des propriétés physicochimiques des ligands utilisés contribue à l'interprétation des résultats obtenus lors des expériences d'incorporation cellulaire. Les valeurs des propriétés chimiques calculés avec QikProp pour les ligands te1pa, do2pa, et dota ; et les valeurs typiques de la plupart (95 %) de médicaments sont présentées dans le **Tableau 7**.

Tableau 7 : Propriétés physicochimiques des ligands utilisés dans ce travail, obtenues grâce au logiciel QikProp.

	Gamme 95 % médicaments	**te1pa**	**do2pa**	**dota**
Poids moléculaire	(130/725)	335,45	442,52	404,42
Log P octanol/eau	(-2/6,5)	-2,13	-2,29	-4,35
Surface polaire	(7/200)	94,12	141,75	209,20
Donneurs pont H	(0,0/6,0)	4,00	4,00	4,00
Accepteurs pont H	(2/20)	9,50	13,00	16,00
Log BB sang/cerveau	(-3/1,2)	0,23	-0,84	-2,90

Le poids moléculaire est un facteur critique pour l'incorporation des molécules dans le cerveau. Par exemple, les molécules avec un poids moléculaire inférieur à 300 D ont des rapports entre la concentration cérébrale et la concentration sanguine de 2,2, tandis que pour les molécules de plus de 700 D, ce rapport est de 0,1 (Gleeson, 2008).

Log P est le logarithme de partition entre l'octanol et l'eau, qui est utilisé comme une mesure quantitative de la lipophilie. Il est calculé à partir de la surface polaire et les donneurs et accepteurs de ponts d'hydrogène. Par ailleurs, une autre mesure de la lipophilie est la surface polaire, correspondant à la surface de Van der Waals des atomes polaires d'azote et oxygène.

Les atomes donneurs ou accepteurs de ponts d'hydrogène permettent aux molécules de former des ponts d'hydrogène en solution aqueuse, ce qui diminue la lipophilie des molécules.

Finalement, Log BB est défini comme étant le logarithme du rapport de la concentration d'un médicament dans le cerveau à celle dans le sang, mesurée à l'équilibre. Cet indice de perméabilité de la BHE peut être utilisé pour prédire l'incorporation des médicaments dans le cerveau (Kelder *et al.,* 1999 ; Vilar *et al.,* 2010).

Il est important de remarquer que les propriétés chimiques analysées pour te1pa et do2pa s'insèrent dans les propriétés de 95 % de médicaments, à l'exception de Log P. Cependant, les ligands te1pa et do2pa sont plus lipophiles que le dota. La lipophilie des deux complexes est similaire, avec une différence entre les deux valeurs de log P de seulement 0,16, étant la lipophilie du te1pa légèrement supérieure à celle du do2pa.

Lorsqu'on considère l'effet de la structure tridimensionnelle sur la lipophilie des complexes $[Eu(do2pa)]^+$ et $[Cu(te1pa)]^+$, on se rend compte que dans le complexe $[Eu(do2pa)]^+$, les deux groupes carboxylates sont liés au noyau métallique (Rodríguez-Rodríguez *et al.,* 2012). Par contre, dans le complexe $[Cu(te1pa)]^+$, le groupe carboxylate n'est pas directement lié au métal et il peut former des ponts d'hydrogène avec des molécules d'eau voisines (Lima *et al.,* 2012). Ce fait pourrait réduire la lipophilie du $[Cu(te1pa)]^+$ par rapport à l'$[Eu(do2pa)]^+$, et ceci pourrait expliquer que l'accumulation intracellulaire du $[Cu(te1pa)]^+$ soit inférieure à celle de l'$[Eu(do2pa)]^+$.

4.9 Conclusion

Les résultats obtenus lors des expériences de cinétique d'incorporation cellulaire nous permettent de suggérer que les complexes $[Gd(do2pa)]^+$ et $[Cu(te1pa)]^+$ pourraient être candidats pour le développement d'agents d'imagerie perméables aux membranes cellulaires.

En ce qui concerne le développement des molécules pour la détection du peptide Aβ à l'intérieur du cerveau, les complexes étudiés ici seraient des candidats plus prometteurs que le molécules basées sur le $[Gd(dota)]^-$, compte tenu de sa perméabilité négligeable vis-à-vis de membranes cellulaires.

Par contre, les complexes basés sur des groupes picolinate, $[Eu(do2pa)]^+$ et $[Cu(te1pa)]^+$, sont capables de traverser la membrane plasmique des cellules K562 et K562/ADR. Les résultats obtenus suggèrent qu'ils ne sont pas des substrats de la P-gp. En plus, l'élimination du $\Delta\psi_{mit}$ avec l'utilisation du FCCP n'entraîne pas un changement de l'incorporation intracellulaire du complexe $[Eu(do2pa)]^+$, ce qui suggère que ce complexe ne s'accumule pas dans la mitochondrie.

Les deux complexes montrent une accumulation intracellulaire importante mais pas excessive. Si les complexes s'accumulaient fortement à l'intérieur des cellules, le passage du complexe dans le côté abluminal des cellules endothéliales pourrait être compromis.

Les résultats des expériences d'incorporation cellulaire montrent que ces complexes suivent la relation générale entre les considérations de charge et lipophilie et l'incorporation cellulaire. Ainsi, les complexes chargés positivement sont capables de s'accumuler dans les cellules, tandis que le complexe chargé négativement ne le fait pas.

Finalement, la différence de lipophilie entre les deux complexes pourrait expliquer la différence d'accumulation intracellulaire.

Les résultats obtenus nous ont conduits à envisager la synthèse d'un complexe basé sur le $[Cu(te1pa)]^+$ fonctionnalisé avec un marqueur des plaques amyloïdes, comme on explique dans le chapitre suivant. Nous avons fait le choix d'utiliser le $[Cu(te1pa)]^+$ à la place de l'$[Eu(do2pa)]^+$ car la plus faible incorporation intracellulaire du $[Cu(te1pa)]^+$ (~3,5 fois plus faible) serait compensée avec la plus forte sensibilité de la TEP par rapport à l'IRM (10.000 - 1.000.000 fois plus forte) (Prodi *et al.*, 2015).

Chapitre 5.
Synthèse du complexe [Cu(te1pa-ONO)]$^{+}$, caractérisation optique et cytotoxicité

«What are the three most important rules of the chemist?
This I knew from Ben.
Label clearly. Measure twice. Eat elsewhere»
Quelles sont les trois règles essentielles que doit respecter un chimiste ?
Ça, c'est Ben qui me l'avait appris.
Tout étiqueter clairement. Tout mesurer deux fois. Ne pas manger sur place.

Patrick Rothfuss, The name of the wind

5.1 Objectif de la synthèse

Ces dernières années, l'imagerie médicale est devenue un outil incontournable dans le cadre du diagnostic de la maladie d'Alzheimer. Ceci a encouragé le développement de nouveaux agents d'imagerie.

Les radiotraceurs à base de cuivre sont une alternative intéressante aux radiotraceurs marqués au ^{11}C et au ^{18}F. Comme mentionné dans le chapitre 2, compte tenu de l'existence de quatre isotopes de cuivre actifs en TEP, il est possible de supposer qu'un seul ligand capable de complexer rapidement l'ion Cu^{2+} serait capable de produire toute une gamme de radiotraceurs avec une demi-vie différente, permettant ainsi l'ajustement de la demi vie du radioisotope à l'expérience clinique (Garcia-Alloza et Bacskai, 2004 ; Hickey *et al.*, 2013 ; Hayne *et al.*, 2014).

Par ailleurs, l'utilisation de ^{64}Cu permettrait notamment d'établir des réseaux de production et distribution, afin d'utiliser ces radiotraceurs loin du site de synthèse. De plus, la complexation du ligand est une alternative intéressante à la liaison covalente nécessaire pour des radiotraceurs plus habituels comme le ^{11}C ou le ^{18}F, qui souvent nécessite un équipement spécialisé (Hickey *et al.*, 2013).

Comme énoncé précédemment dans le chapitre 4, le complexe $[Cu(te1pa)]^+$ posséde une bonne stabilité thermodynamique et cinétique. Il est aussi capable de traverser la membrane plasmique et de s'incorporer dans les cellules K562 et K562/ADR. De plus, les résultats exposés dans le chapitre 4 suggèrent que ce complexe n'est pas un substrat de la P-gp. Toutes ces propriétés font du $[Cu(te1pa)]^+$ un bon candidat pour envisager la synthèse de molécules utilisables en imagerie médicale capables de traverser les membranes cellulaires.

Dans le cadre du diagnostique de la maladie d'Alzheimer et en utilisant comme base le $[Cu(te1pa)]^+$, nous avons synthétisé une molécule qui pourrait servir comme radiotraceur capable de cibler les plaques amyloïdes, présentes dans le cerveau des

patients atteints par cette maladie. Ainsi, nous avons attaché de façon covalente un marqueur des plaques amyloïdes au [Cu(te1pa)]$^+$, afin de synthétiser une molécule qui pourrait être utilisé en imagerie par TEP. Le marqueur de plaques amyloïdes que nous avons choisi pour cette synthèse est un dérivé d'aryl-benzofuranne (ONO), capable de se lier avec une bonne affinité aux plaques amyloïdes, dont la synthèse est moins complexe et avec un plus grand rendement que celle du PIB.

Dans ce chapitre nous décrirons la synthèse de l'ONO et du complexe [Cu(te1pa-ONO)]$^+$. Ensuite, les résultats obtenus lors des études réalisées en collaboration avec le Dr. Chatchanok Udomtanakunchai de l'Université Chiang Mai (Thaïlande), concernant la caractérisation optique (absorbance et fluorescence) et la cytotoxicité de deux composés seront exposés. Par ailleurs, la cinétique d'incorporation intracellulaire de l'ONO dans les cellules K562 et K562/ADR sera discutée.

5.2 Synthèse de l'ONO

Le marqueur du peptide Aβ que nous avons choisi pour la synthèse est la 4-(5-méthoxybenzofuran-2-yl)aniline (ONO) (**Figure 34**). Cette molécule est capable de détecter les plaques amyloïdes (Ono et al., 2006). La méthode utilisée par ces auteurs pour mesurer l'affinité vers les plaques amyloïdes est l'inhibition compétitive de la liaison du [^{125}I]IMPY avec le peptide Aβ *in vitro* (Zhuang *et al*., 2003). Ainsi, pour l'ONO la valeur de Ki est de 2,3 nM, tandis que celle du PIB et du flutemetamol sont 4,3 nM et 5,9 nM respectivement (Yang et Cui, 2014).

Une autre raison pour laquelle nous avons sélectionné l'ONO pour cette synthèse, est que l'amine primaire liée au cycle aromatique permet un couplage de Buchwald-Hartwig entre cette amine et le chlorure aromatique de la position 4 du bras picolinate (voir section 5.3.3). De plus, l'ONO est facilement synthétisé à partir de précurseurs commerciaux en deux étapes.

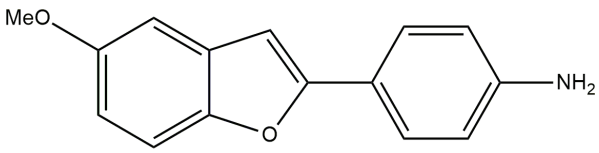


Figure 34 : Structure de l'ONO

En général, il existe trois méthodes de synthèse pour la production de 2-aryl-benzofurannes comme l'ONO (**Figure 35**) (Yang et Cui, 2014). Les premiers dérivés de benzofuranne développés comme marqueurs des plaques amyloïdes ont été synthétisés grâce à une réaction de Wittig intramoléculaire (voie A) (Ono *et al.*, 2002). Une autre méthode de synthése est basée sur le couplage de Suzuki du benzofuranne avec un iodure aromatique (voie B). Cette méthode a été utilisée dans des autres publications par le même groupe (Cheng *et al*., 2010 ; Ono *et al.*, 2013). Cependant, une troisième méthode proposée est la condensation en milieu basique d'un 2-hydroxybenzaldéhyde avec un bromure de benzyle (voie C) (Ono *et al.*, 2010b). Dans notre cas, nous avons choisi cette dernière voie parce que seulement deux étapes sont nécessaires pour obtenir l'ONO avec des bons rendements à partir de précurseurs commerciaux (Ono *et al.*, 2010b).

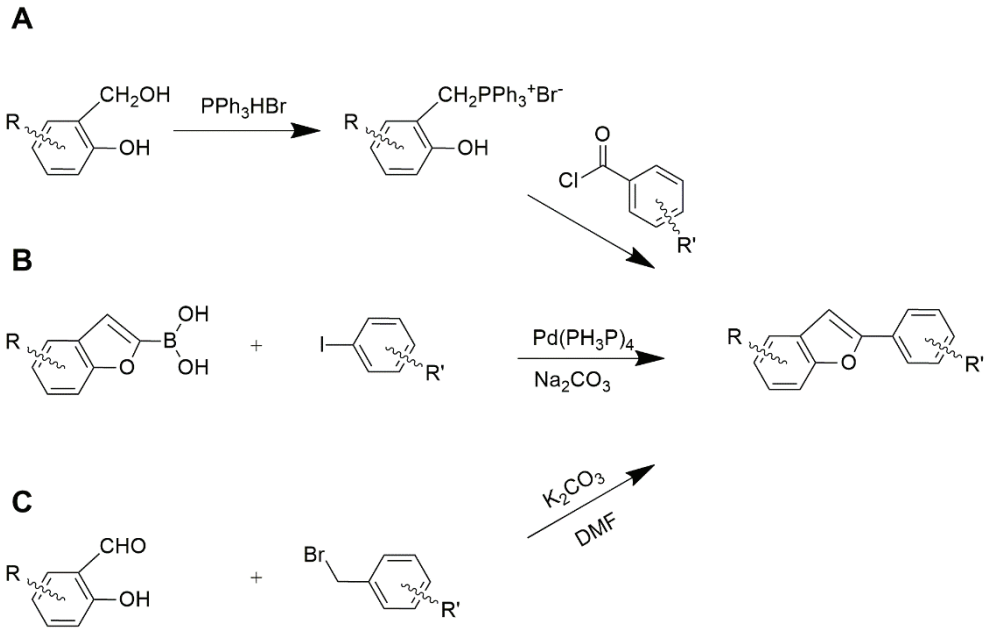


Figure 35 : Différentes méthodes pour la production des 2-aryl-benzofurannes (Yang et Cui, 2014).

Brièvement, la condensation en présence de carbonate de potassium du bromure de 4-nitrobenzyle et du 2-hydroxy-5-méthoxybenzaldehyde donne lieu au 5-méthoxy-2-(4-nitrophényl)benzofuranne **(1)** (74 %) (Ono *et al.*, 2010b). Ensuite, l'utilisation de chlorure d'étain dans l'éthanol permet de réduire le groupe nitro du produit de condensation en amine, pour obtenir l'ONO **(2)** (58 %) (**Figure 36**).

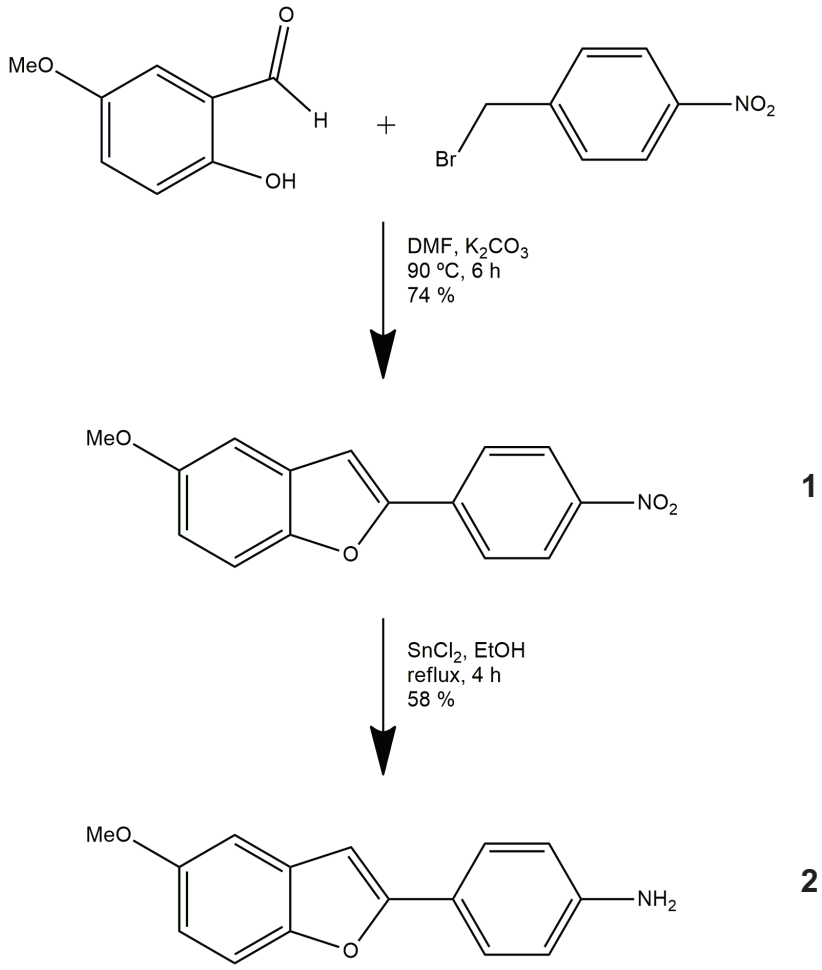


Figure 36 : Synthèse de l'ONO

Le mécanisme de la condensation est présenté dans la **Figure 37**. La déprotonation de l'alcool par la base (I) cause l'attaque nucléophile sur le carbone benzylique lié à l'atome de brome, qui est éliminé comme groupe partant pour former l'éther (II). La déprotonation du carbone saturé en position α par rapport à l'éther produit un anion stabilisé par résonance (III). Le cycle est formé après l'attaque nucléophile sur le carbonyle (IV). La déprotonation du même C_α force l'élimination de l'alcool grâce à la stabilisation par résonance, ce qui conduit au produit final (V).

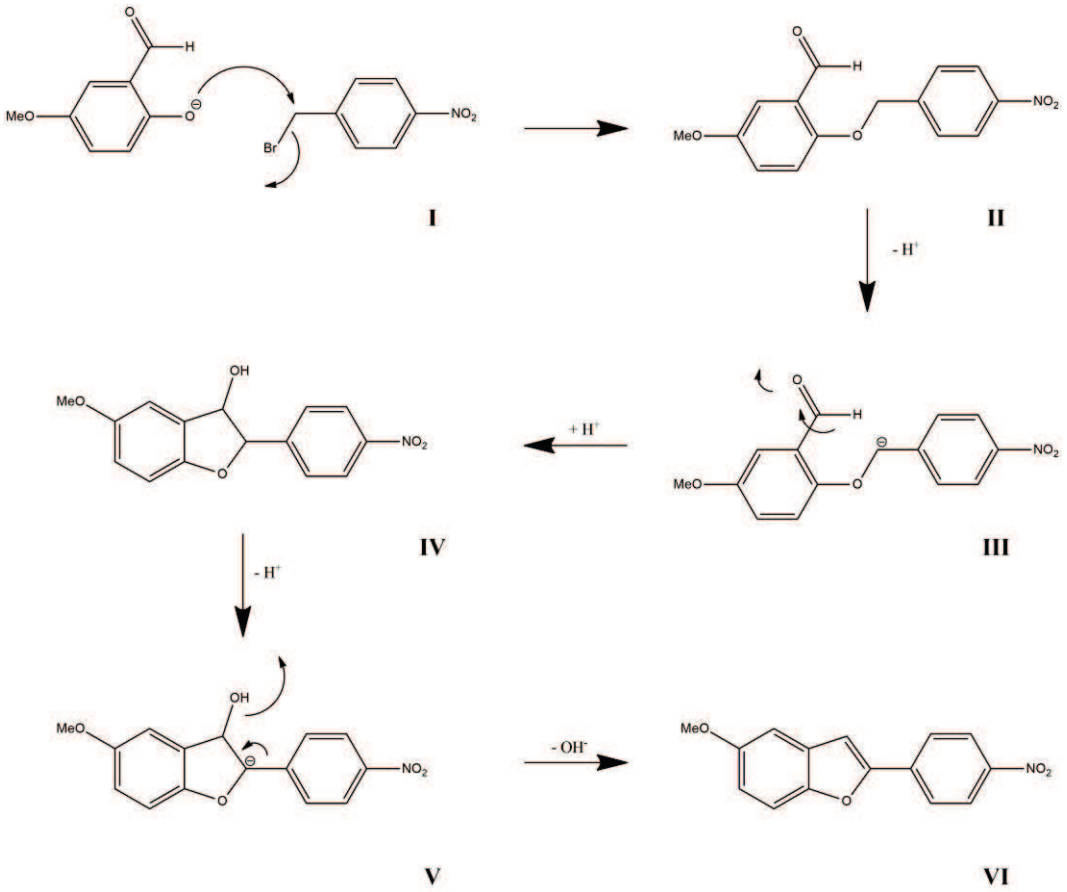
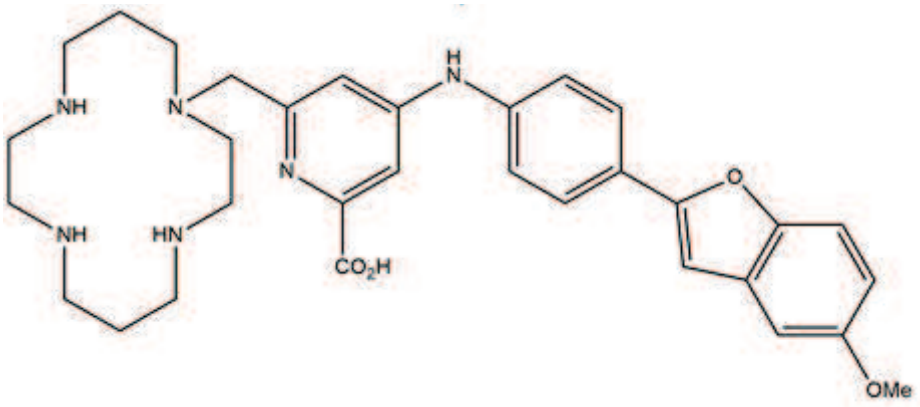


Figure 37 : Mécanisme de la condensation

5.3 Synthèse du $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$

Un ligand comme le te1pa-ONO (**Figure 38**) pourrait avoir la capacité de complexer le cuivre avec une élevée stabilité thermodynamique et cinétique grâce au motif macrocyclique et ceci permettrait son utilisation en TEP après la complexation d'un radioisotope comme le ^{64}Cu. De plus, il pourrait présenter une affinité vers les plaques amyloïdes grâce au dérivé d'aryl-benzofuranne, le rendant prometteur pour l'imagerie médicale dans le cadre du diagnostic de la maladie d'Alzheimer.



9

Figure 38 : Structure du te1pa-ONO.

Dans ce contexte, il paraît logique d'envisager une structure où on essaie d'éloigner le plus possible le marqueur des plaques amyloïdes des centres d'union entre le métal et le ligand, afin de ne pas interférer ni dans la stabilité du complexe ni dans la détection des plaques amyloïdes. En effet, si le marqueur est introduit trop près du complexe, son affinité vers les plaques amyloïdes pourrait être altérée par des effets électroniques et stériques du complexe. Cette logique a été suivie dans notre travail. En même temps, il est important de prendre en compte que la taille du complexe modifie son passage à travers la BHE. A priori, les molécules dont le poids moléculaire est supérieur à 700 D ne seront pas capables de traverser la BHE (Gleeson, 2008). Ainsi, il est nécessaire de trouver un compromis entre le poids moléculaire du complexe, la conservation de la stabilité du complexe, et la capacité de détecter les plaques amyloïdes.

Le couplage du marqueur des plaques amyloïdes au macrocycle te1pa peut être envisagé par différentes voies, conduisant à la liaison : par la C-fonctionnalisation du macrocycle (A), par la N-fonctionnalisation du même (B), par la dérivatisation du carboxylate (C) ou par la C-fonctionnalisation du groupe picolinate (D) (**Figure 39**).

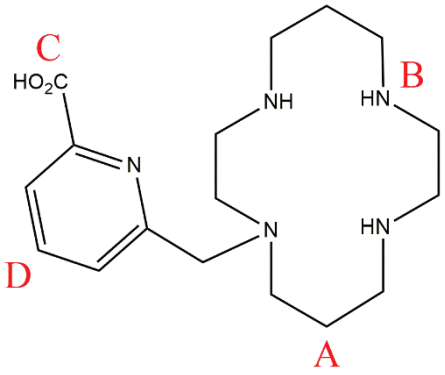


Figure 39 : Les quatre possibilités de couplage du marqueur au macrocycle te1pa. A : C-fonctionnalisation du macrocycle. B : N-fonctionnalisation du macrocycle. C : Dérivatisation via la fonction carboxylique. D : C-fonctionnalisation du bras picolinate dans la position 4.

C-fonctionnalisation du macrocycle

La production de tétraazamacrocycles peut être faite à partir d'une tétraamide linéaire, grâce à l'intervention de la butanedione pour former un bisaminal qui fixe les amines dans une disposition tridimensionnelle favorisant la création du macrocycle (Hervé *et al.*, 1998). Ensuite, le macrocycle est fermé par l'insertion d'un dérivé di-bromé (**Figure 40**).

La C-fonctionnalisation du macrocycle est envisageable avec la cyclisation en utilisant, à la place du dérivé di-bromé, une autre molécule telle que la α-méthylène-γ-butyrolactone utilisée dans les travaux de Camus et collaborateurs (Camus *et al.*, 2015). Cette route amène à la formation de macrocycles C-fonctionnalisés avec une fonction hydroxyéthyle ou aminoéthyle. Cependant, cette voie rend difficile l'insertion du groupe picolinate du te1pa.

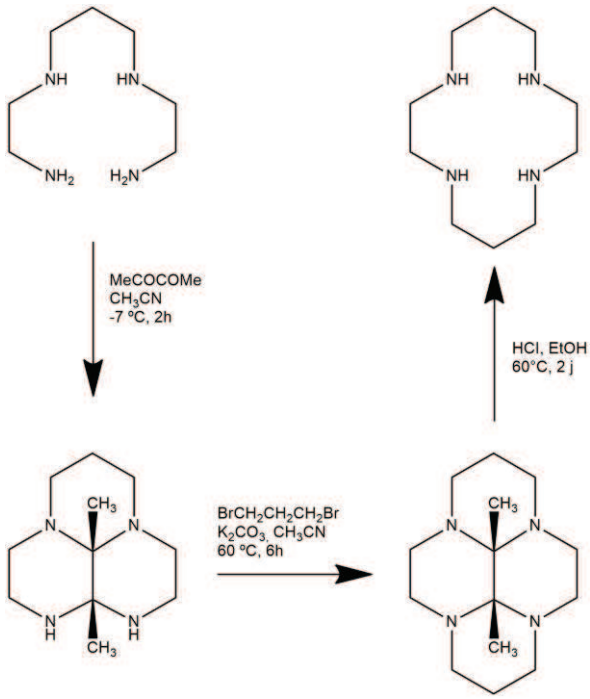


Figure 40 : Formation du cyclam avec la méthode d'Hervé et collaborateurs (Hervé *et al.*, 1998).

N-fonctionnalisation du macrocycle

La N-fonctionnalisation du macrocycle peut être envisagée par la méthode suivante : suite à la formation du cyclam bisaminal (expliqué antérieurement), la réaction avec un équivalent de picolinate halogéné dans le tétrahydrofuranne entraîne la précipitation du sel mono-dérivé. Ensuite, l'amine libre peut réagir avec un dérivé approprié d'un marqueur du peptide Aβ contenant un chlorure comme groupe partant. Cependant, l'insertion d'une structure polyaromatique dans les alentours du métal pourrait très probablement conduire à une modification des propriétés de stabilité du complexe.

Dérivatisation via la fonction carboxylique

Dans le $[Cu(te1pa)]^{+}$, la fonction carboxylate du picolinate ne fait pas partie de la sphère de coordination du cuivre (**Figure 25**). Ce groupe fonctionnel pourrait être couplé avec un marqueur des plaques amyloïdes via la formation de l'amide.

Cependant, ce n'est pas le cas dans des autres complexes comme le [Ln(do2pa)]$^{+}$, car les carboxylates du picolinate contribuent à la complexation du métal (**Figure 23**). Ainsi, cette voie n'a pas été choisie dans la volonté de trouver une méthode plus générale pour cette famille de ligands.

C-fonctionnalisation du bras picolinate dans la position 4

Dans cette méthode, choisie dans notre travail, un dérivé de picolinate ayant un chlorure comme groupe fonctionnel capable de réagir avec le marqueur des plaques amyloïdes est synthétisé, puis couplé au macrocycle. Le chlorure doit apparaître dans la position 4 de la pyridine pour éloigner le plus possible le marqueur des plaques amyloïdes de l'environnement électronique de la sphère de coordination du macrocycle, afin de ne pas interférer avec la stabilité de la complexation du métal, ni avec l'affinité du marqueur vers les plaques amyloïdes. Cette position a aussi l'avantage de maintenir la symétrie pendant la synthèse du picolinate, permettant d'éviter la formation de régioisomères.

Notre stratégie de synthèse a été basée donc sur la synthèse distincte de trois fragments : d'une part le marqueur, d'autre part le bras picolinate, enfin le macrocycle protégé, pour finalement réaliser le couplage postérieur de ces trois fragments.

5.3.1 Synthèse du bras picolinate

L'acide picolinique est un dérivé de la pyridine avec un acide carboxylique dans la position 2. Les groupes picolinates sont des ligands bidentates dont l'affinité vis-à-vis des ions Ln^{3+} est connue (Regueiro-Figueroa *et al.*, 2011 ; Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2015). L'inclusion de ces fragments dans le squelette macrocyclique améliore la stabilité thermodynamique et cinétique des ligands, car l'azote de la pyridine et le groupe carboxylate peuvent agir comme des bases de Lewis dans la sphère de coordination du métal.

La synthèse de dérivés de l'acide picolinique avec des groupes fonctionnels dans la position 4 a pour précurseur l'acide chélidamique. Le traitement de l'acide

chélidamique avec le chlorure de thionyle conduit à une réaction de substitution résultant en l'introduction d'un atome de chlore dans la position 4 du picolinate (**Figure 41**). Le chlore a été sélectionné car il peut agir ultérieurement comme groupe partant dans une réaction de Buchwald-Hartwig catalysée par le palladium avec le marqueur des plaques amyloïdes. La méthylation des fonctions acides conduit au diester méthylique, c'est-à-dire, le 4-chloropyridine-2,6-dicarboxylate de diméthyle **(3)** (84 %).

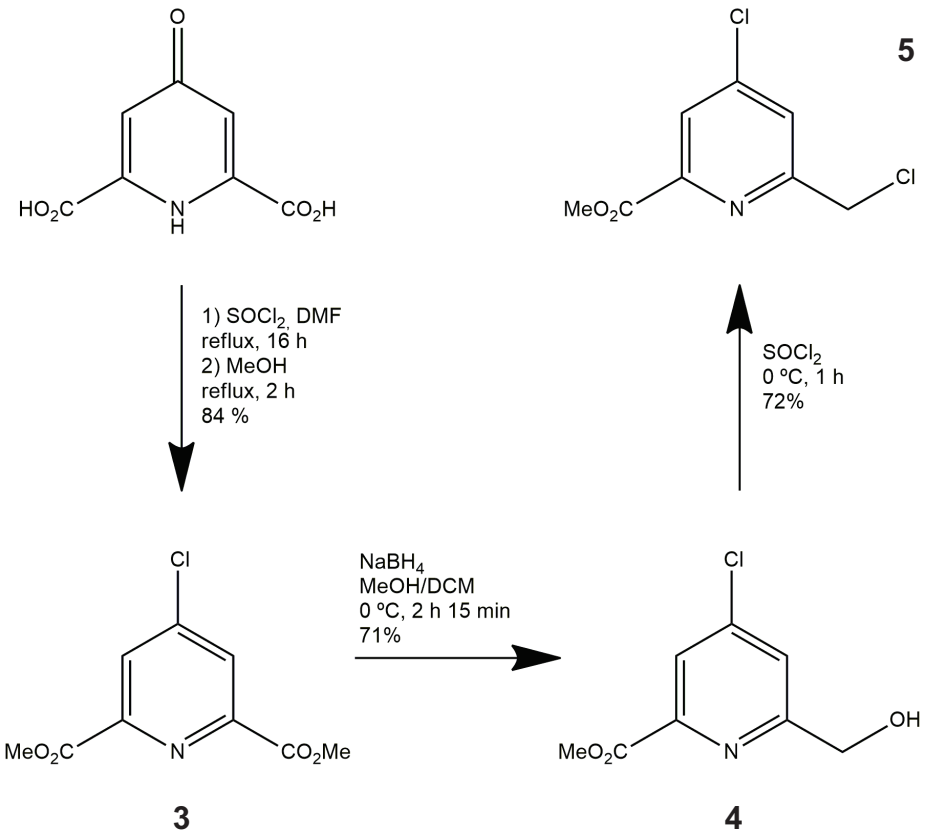


Figure 41 : Obtention du di-chlore à partir de l'acide chélidamique

L'union du bras picolinate avec le macrocycle nécessite la fonctionnalisation d'un des deux esters méthyliques symétriques du picolinate pour obtenir un chlorure benzylique. L'utilisation de borohydrure de sodium dans des conditions douces permet la monoréduction d'un des deux esters en alcool pour obtenir le 4-chloro-6-

(hydroxyméthyl)picolinate de méthyle **(4)** (71 %). Grâce à la symétrie du composé, un seul isomère est formé. Le traitement de l'alcool obtenu avec le chlorure de thionyle permet de substituer le groupe alcool par un atome de chlore (72 %). Le résultat de cette synthèse est le 4-chloro-6-(chlorométhyl)picolinate de méthyle **(5)**, un dérivé de picolinate fonctionnalisé avec un chlorure benzylique et un chlorure aromatique.

5.3.2 Protection du macrocycle et insertion du bras picolinate

Pour pouvoir introduire le bras picolinate dans le macrocycle par N-fonctionnalisation d'une des amines, il est nécessaire de protéger le cyclam en premier lieu (**Figure 42**).

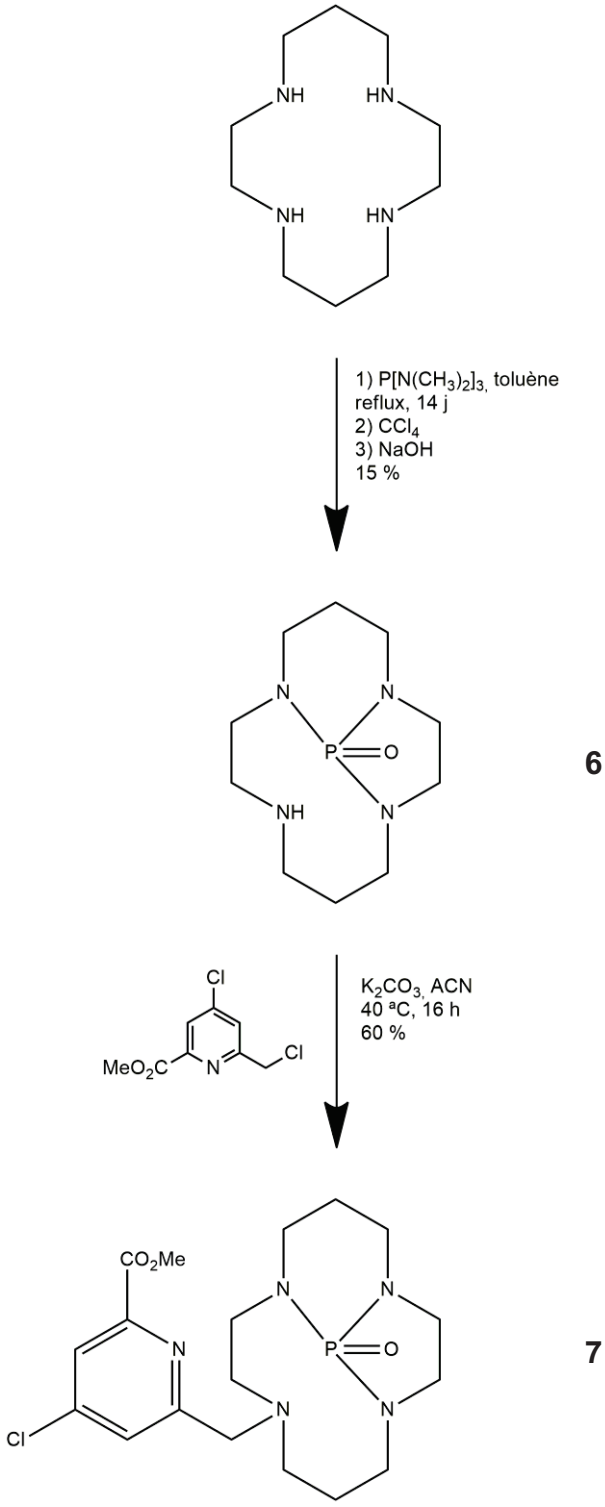


Figure 42 : Protection du macrocycle et liaison du bras picolinate.

L'insertion d'un groupe phosphoryle (≡P=O) à l'intérieur de la cavité du cyclam, ce qui conduit au composé nommé cyclam PO **(6)** (15 %), laissant une fonction amine disponible pour une alkylation ultérieure (**Figure 43**).

Le phosphore provenant de la tris(diméthylamino)phosphine s'introduit au sein du macrocycle et se lie aux amines macrocycliques, produisant le polyaminophosphorane avec une tautomérie entre le phosphore(III) et le phosphore(V). Le traitement avec tétrachlorométhane fait précipiter le sel de chlorure de phosphore(V). L'hydrolyse à l'hydroxyde de sodium libère une des amines, laissant les trois autres amines protégées par le phosphoryle (Filali *et al.*, 1991 ; Lima *et al.*, 2012).

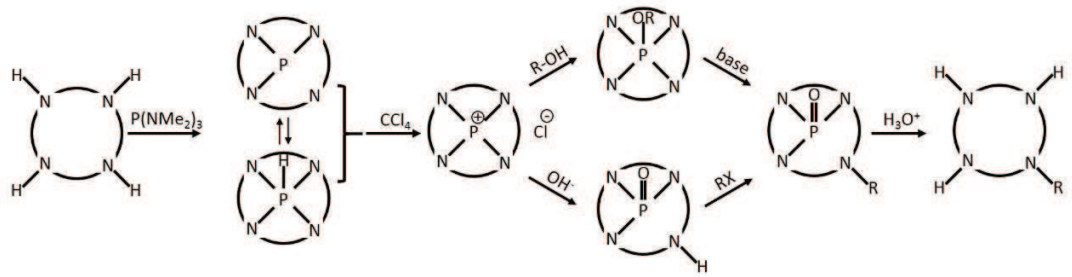


Figure 43 : Protection avec groupe phosphoryle, fonctionnalisation et deprotection du macrocycle (Filali *et al.*, 1991).

Cette amine libre est capable de faire une substitution nucléophile en présence de carbonate de potassium comme base, sur le chlorure benzylique du 4-chloro-6-(chlorométhyl)picolinate de méthyle. Le chlorure benzylique est plus réactif que le chlorure aromatique, conduisant à l'obtention du cyclam-PO-chloropicolinate **(7)** (60 %).

5.3.3 Couplage et déprotection du macrocycle

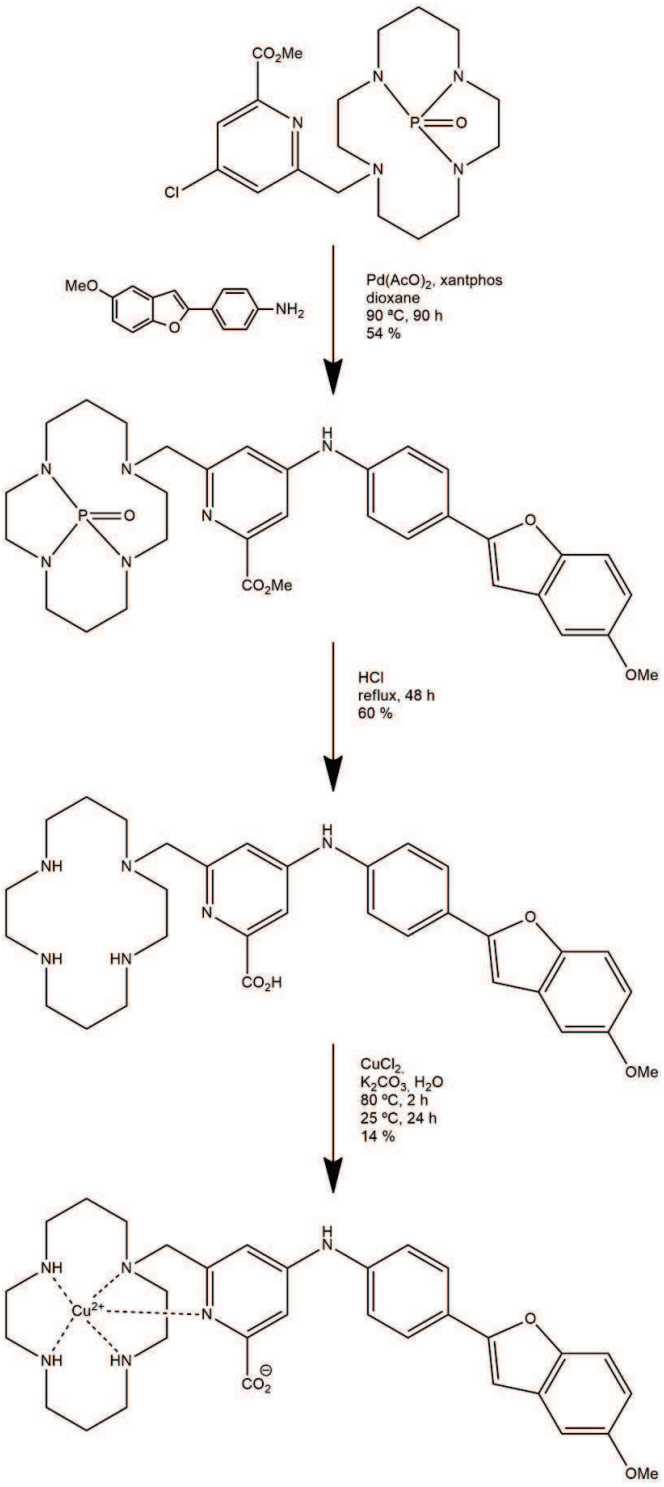


Figure 44 : Couplage des trois fragments pour obtenir le ligand final.

Un couplage de Buchwald-Hartwig en utilisant un système catalytique d'acétate de palladium(II) et xantphos (Kamer *et al.*, 2001), et en présence de carbonate de césium comme base, nous a permis de coupler le bras picolinate, déjà lié au macrocycle, au marqueur des plaques amyloïdes pour obtenir le cyclam-PO-picolinate-ONO **(8)** (54 %) (**Figure 44**). Nous avons observé que la préparation au préalable du catalyseur est nécessaire pour que la réaction fonctionne.

Le cycle catalytique du couplage de Buchwald-Hartwig (**Figure 45**) commence à partir du complexe du Pd^{0} avec le Xantphos (**I**), obtenu par réduction du Pd^{2+} initial (Louie et Hartwig, 1995 ; Wolfe *et al.*, 1996 ; Ruiz-Castillo *et al.*, 2015). Une addition oxydante du chlorure d'aryle provenant du cyclam-PO-chloropicolinate conduit au complexe (**II**). La coordination de l'amine aromatique forme le complexe pentacoordiné (**III**), et la déprotonation de cette amine avec le carbonate de césium conduit au complexe (**IV**). Finalement, l'élimination réductrice du produit de couplage conduit à la régénération du catalyseur (**I**).

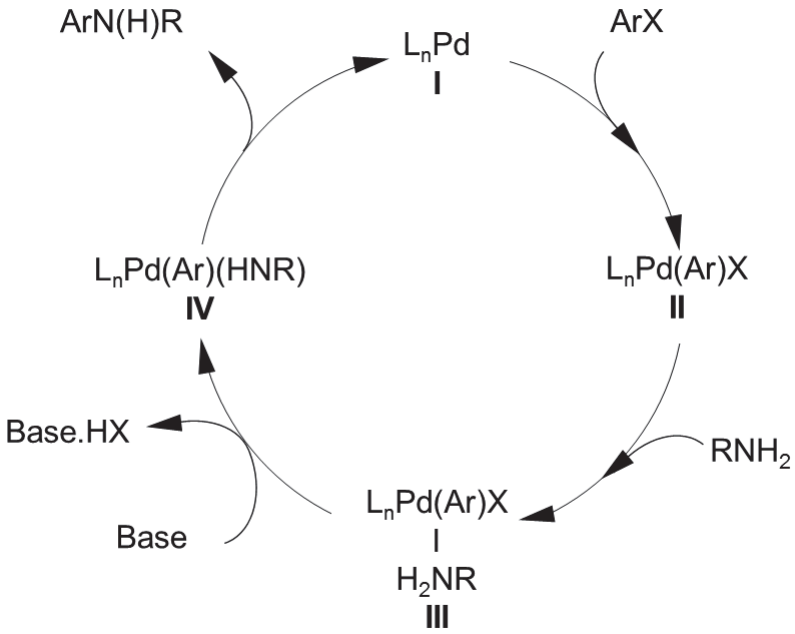


Figure 45 : Cycle catalytique de la réaction de Buchwald-Hartwig avec des ligands bidentates. Pour notre réaction : L_n = Xantphos ; ArX = cyclam-PO-chloropicolinate ; RNH_2 = ONO ; Base = $CsCO_3$. Reproduit de (Ruiz-Castillo *et al.*, 2015) avec la permission de American Chemical Society.

L'hydrolyse en milieu acide du produit résultant du couplage cause la déprotection du phosphoryle et la libération des amines et permet l'obtention du ligand te1pa-ONO **(9)** (60 %). Des analyses de spectrométrie de masse ont montré qu'après une nuit de réaction l'hydrolyse de l'ester picolinique est partielle résultant en un mélange entre l'ester et l'acide d'environ 60 : 40. Par contre, l'hydrolyse est totale après deux jours de réaction. Après l'ajustement du pH à 7, la complexation du ligand avec du chlorure de cuivre donne lieu au complexe $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$ **(10)** (**Figure 46**), avec un faible rendement lié aux difficultés d'isoler le produit et le séparer des sels inorganiques (14 %).

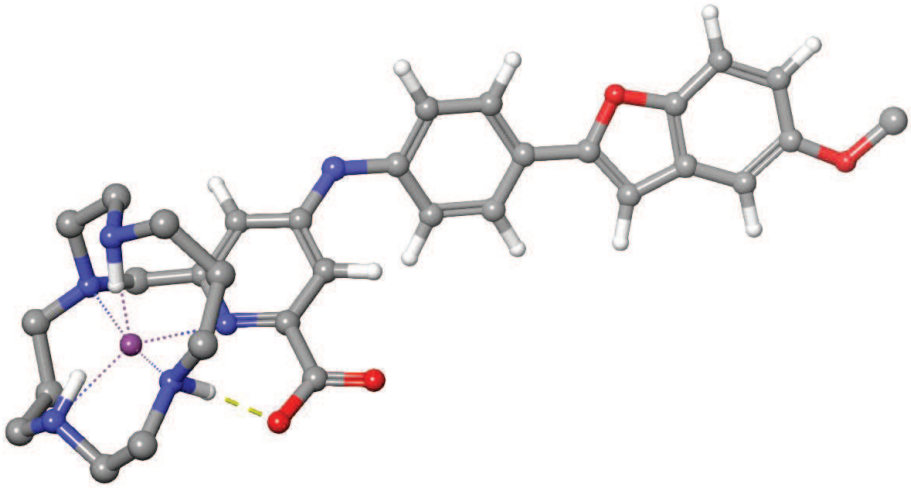


Figure 46 : Représentation tridimensionnelle du [Cu(te1pa-ONO)]$^+$, obtenue à l'aide du logiciel Maestro (Schrödinger Inc.).

5.4 Caractérisation optique de l'ONO et du [Cu(te1pa-ONO)]$^+$

Les spectres d'absorption dans l'UV-visible et les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence de l'ONO et du complexe [Cu(te1pa-ONO)]$^+$ ont été obtenus dans l'eau (pH = 6,0), dans le tampon HEPES/Na^+ à pH 7,3 et dans le tampon PBS à pH 7,3.

Pour l'ONO, les spectres d'absorption ont été obtenus à des concentrations comprises entre 0 et 100 µM (**Figure 47**). Le tracé de l'absorbance en fonction de la concentration de la solution nous a permis de déterminer les coefficients d'absorption molaire. Ces spectres sont tout à fait semblables dans les différentes conditions étudiées. Les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence ont été obtenus à des concentrations comprises entre 0 et 200 nM (**Figure 48**). L'ONO montre un pic d'émission de fluorescence à 410 nm quand il est excité à 325 nm.

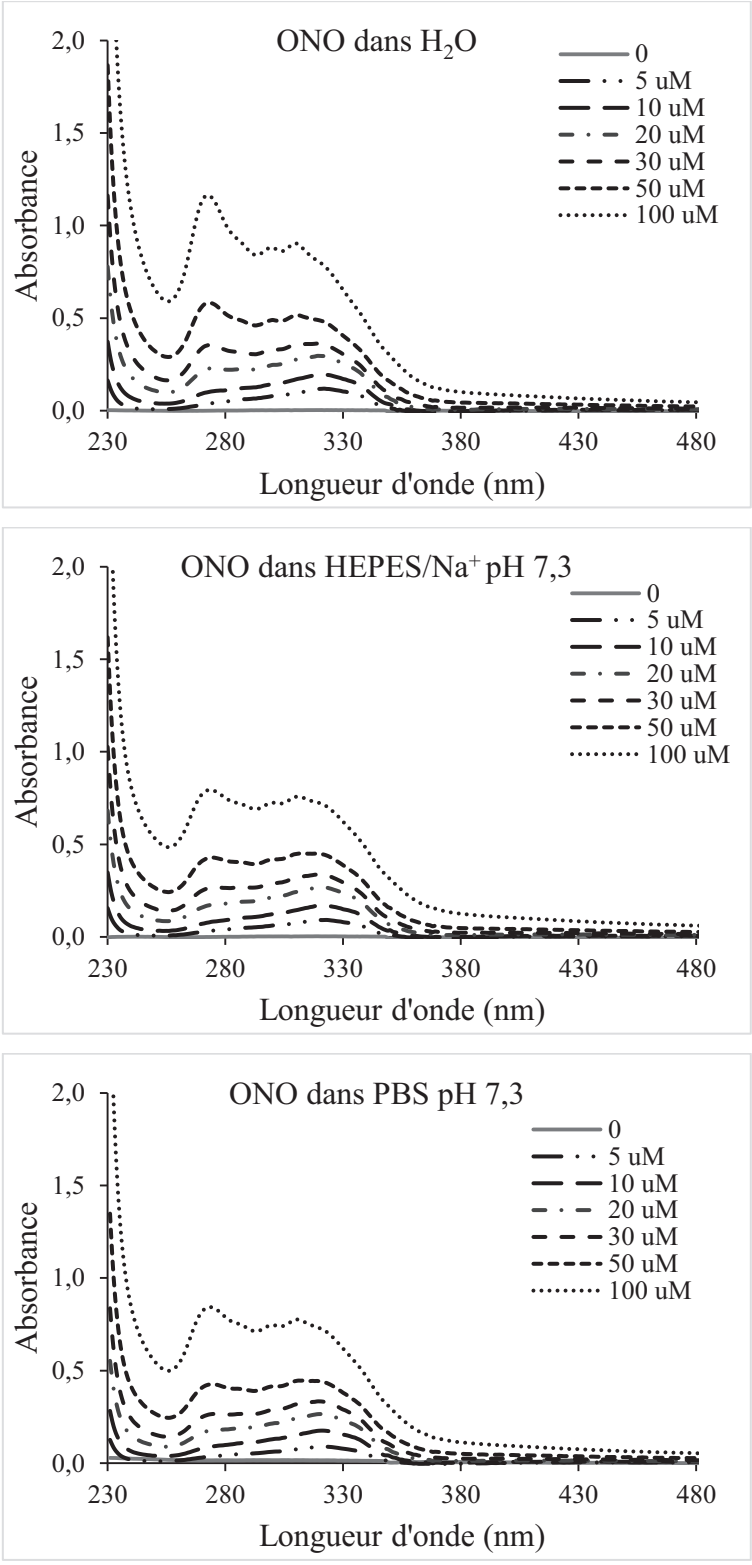


Figure 47 : Spectres d'absorption de l'ONO.

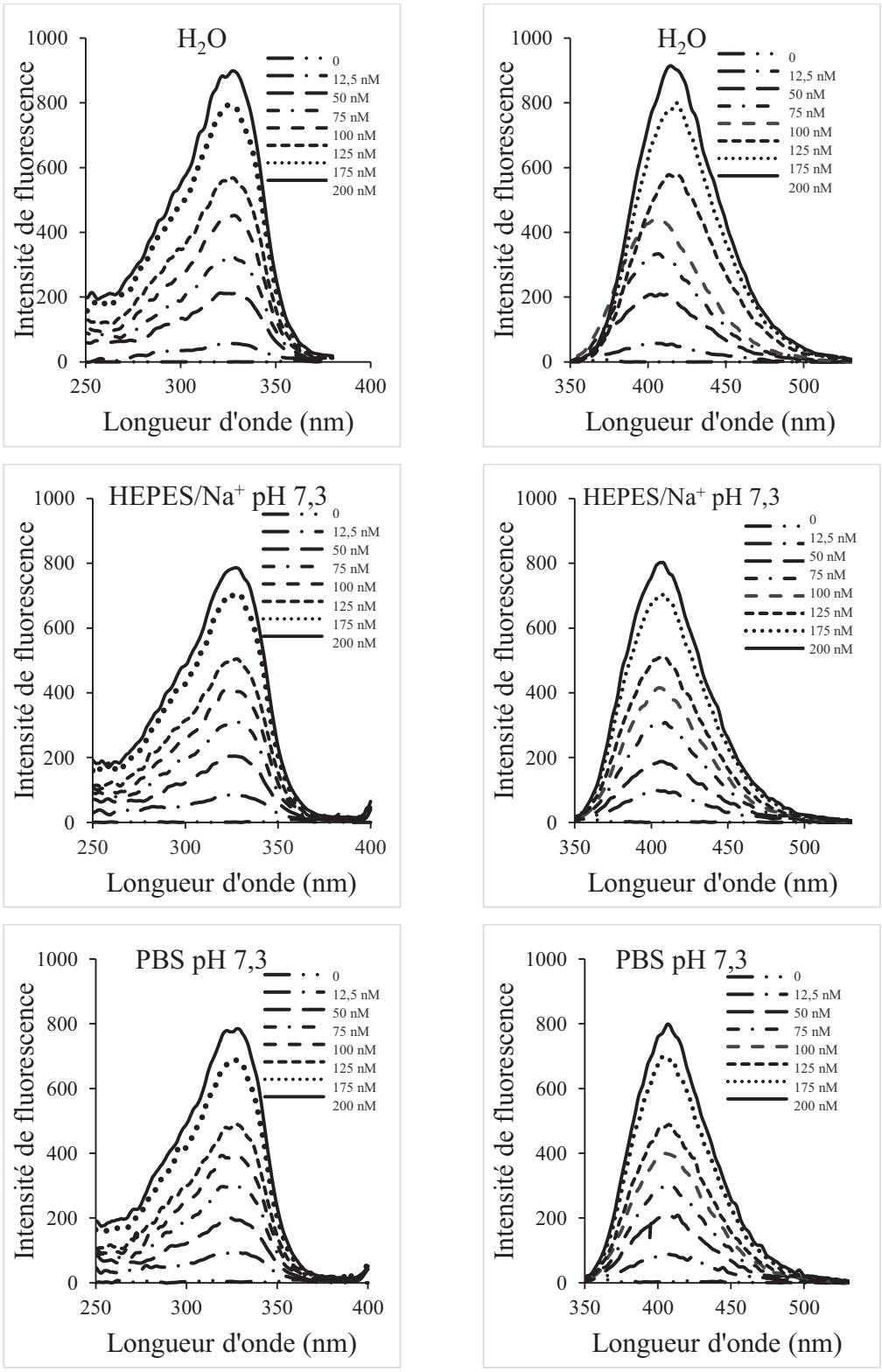


Figure 48 : Spectres d'excitation (gauche ; λ_{em} = 410 nm) et émission (droite ; λ_{exc} = 325 nm) de fluorescence de l'ONO.

Les spectres d'absorption de $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$ ont été obtenus à des concentrations comprises entre 0 et 40 µM (**Figure 49**). Ces spectres sont tout à fait semblables dans les différentes conditions étudiées. Les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence ont été obtenus à des concentrations comprises entre 0 et 50 µM (**Figure 50**). Le $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$ possède un pic d'émission de fluorescence à 410 nm quand il est excité à 345 nm.

Le rendement quantique de fluorescence (Φ) correspond au rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photos absorbés pendant le phénomène de fluorescence. Il est utilisé pour quantifier l'efficacité relative de la fluorescence. Nous avons déterminé le Φ de l'ONO et du $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$ par comparaison avec celui de la rhodamine 6G (Φ = 0,95) (Magde *et al*., 1999). Des solutions mères des composés dans le DMSO à une concentration de 10 mM ont été diluées avec les différentes solutions aqueuses. L'équation suivante permet le calcul de Φ : « Int » étant l'intensité de fluorescence dans le pic d'émission, « A » étant l'absorbance à la longueur d'onde d'excitation, l'indice « $_R$ » indiquant les valeurs correspondantes du standard, et « n » étant l'indice de réfraction du solvant.

$$\Phi = \Phi_R \times \frac{Int}{Int_R} \times \frac{1\text{-}10^{-A_R}}{1\text{-}10^{-A}} \times \frac{n^2}{{n_R}^2} \qquad [11]$$

Le coefficient d'extinction molaire et le rendement quantique de fluorescence de l'ONO sont présentés dans le **Tableau 8**, tandis que ceux de $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$ sont présentés dans le **Tableau 9**.

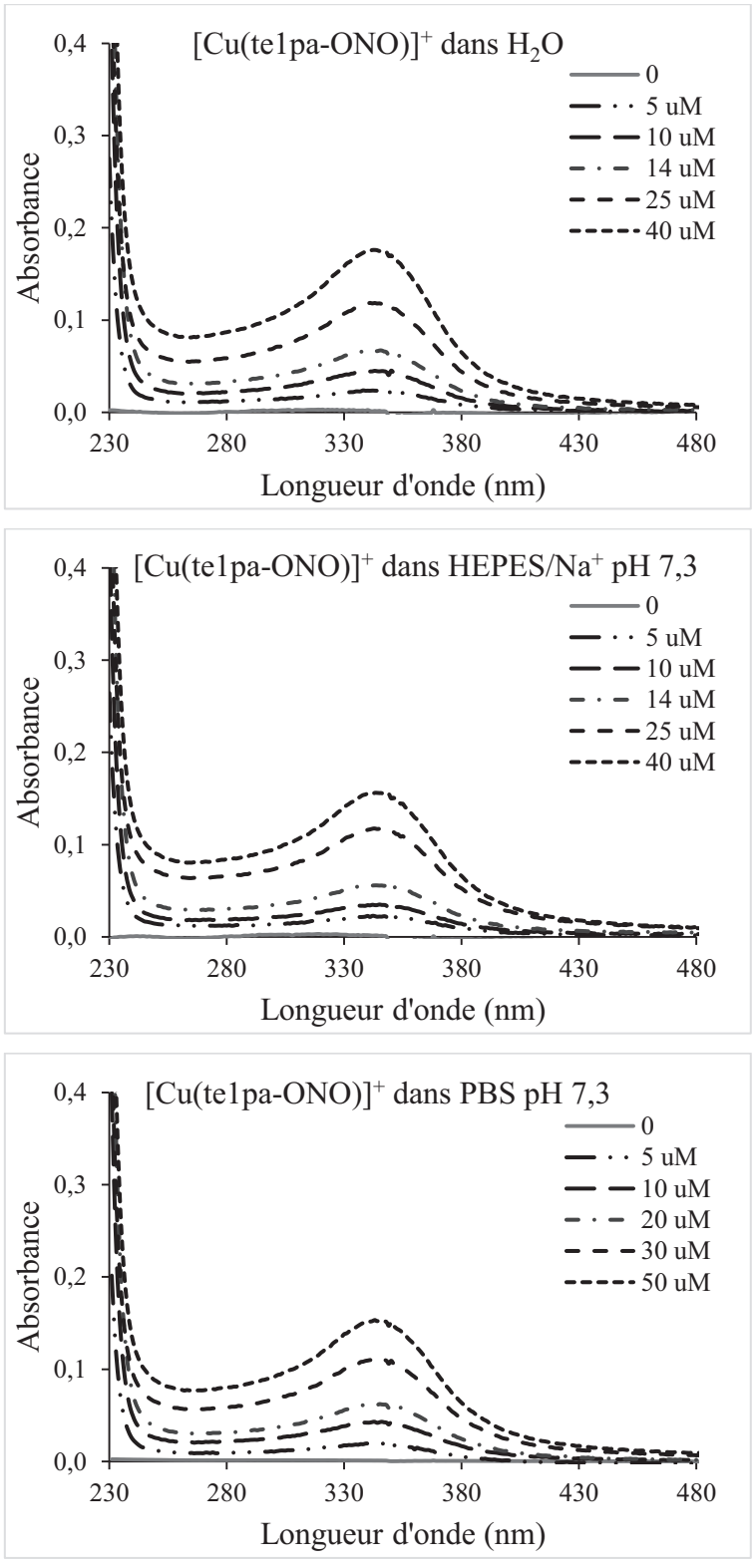


Figure 49 : Spectres d'absorption du [Cu(te1pa-ONO)]$^+$.

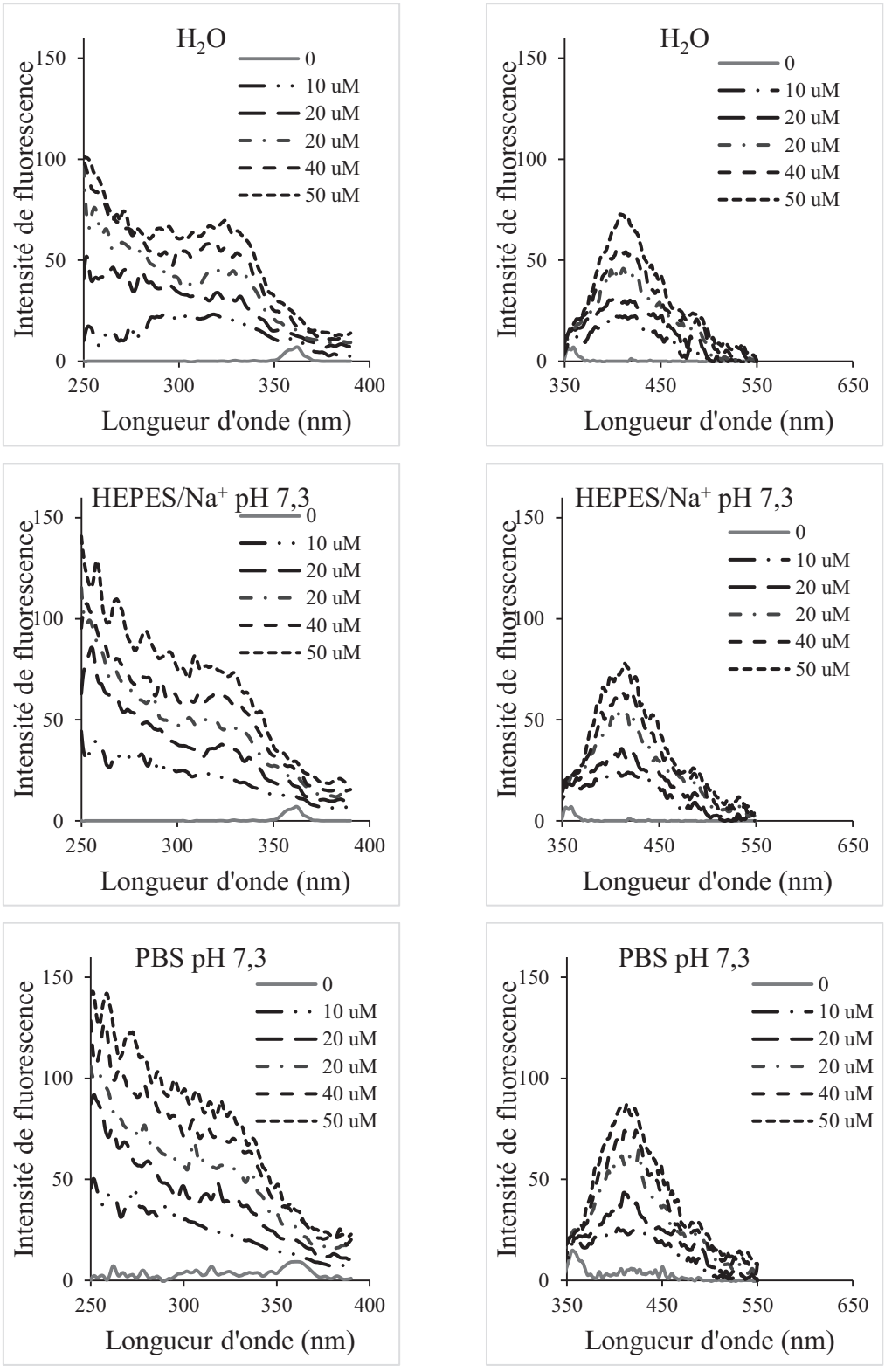


Figure 50 : Spectres d'excitation (gauche ; λ_{em} = 410 nm) et émission (droite ; λ_{exc} = 345 nm) de fluorescence du $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$.

Tableau 8 : Coefficient d'extinction molaire à 325 nm et rendement quantique de fluorescence dans le pic d'émission à 410 nm (λ_{exc} = 325 nm) pour l'ONO dans les solvants H_2O, HEPES/Na^+ pH 7,3, et PBS pH 7,3.

Solvants	Coefficient d'extinction molaire ($M^{-1}.cm^{-1}$)	Rendement quantique (Φ)
H_2O	8560	0,0484
HEPES/Na^+	7987	0,0463
PBS	7982	0,0459

Tableau 9 : Coefficient d'extinction molaire à 345 nm et rendement quantique de fluorescence dans le pic d'émission à 410 nm (λ_{exc} = 345 nm) pour [Cu(te1pa-ONO)]$^+$ dans les solvants H_2O, HEPES/Na^+ pH 7,3, et PBS pH 7,3.

Solvants	Coefficient d'extinction molaire ($M^{-1}.cm^{-1}$)	Rendement quantique (Φ)
H_2O	4624	0,00003
HEPES/Na^+	4247	0,000035
PBS	4265	0,000035

Les résultats montrent que le coefficient d'extinction molaire est réduit d'environ 50 % pour le [Cu(te1pa-ONO)]$^+$ par rapport à l'ONO, et le Φ est 1400 fois plus fort pour l'ONO que pour le complexe.

Cette réduction de l'émission de fluorescence est parallèle à celle observée avec des senseurs fluorescents utilisés pour la détection du cuivre et des autres métaux de transition (Rapisarda *et al*., 2002 ; Jung *et al*., 2009 ; Cotruvo *et al*., 2015). Dans ces senseurs, la liaison du métal produit un phénomène d'extinction de l'émission de fluorescence.

Il a été proposé que l'extinction des fluorochromes par le Cu^{2+} soit causée principalement par des mécanismes de transfert d'énergie ou transfert d'électrons avec la couche électronique *d* du métal, mais aussi par des processus paramagnétiques ou des processus électroniques causés par l'effet « atome lourd » (Varnes *et al*., 1972 ; Banthia et Samanta, 2002 ; Jung *et al*., 2009 ; García-Beltrán *et al*., 2014). Ce type de mécanismes pourrait causer la réduction du rendement quantique du complexe $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$ par rapport à celui de l'ONO.

5.5 Etude de la cytotoxicité et de l'incorporation intracellulaire de l'ONO dans les cellules K562 et K562/ADR

5.5.1 Etude de la cytotoxicité de l'ONO

Bien que l'interaction entre l'ONO et les dépôts amyloïdes soit bien décrite (Ono et al., 2006), nous n'avons pas trouvé d'informations concernant sa toxicité ni sa capacité à pénétrer dans les cellules. Ainsi, avant d'effectuer la synthèse du $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$, nous avons étudié la toxicité et le transport intracellulaire de l'ONO dans les cellules K562 et K562/ADR, pour nous assurer du bon choix de cette molécule.

Les tests de cytotoxicité de l'ONO sur les cellules K562 et K562/ADR ont éte réalisés à des concentrations comprises entre 0 à 100 µM, car au-déla de cette concentration l'ONO précipite. Les cellules ont été mises en culture en présence de concentrations croissantes d'ONO. Après trois jours d'incubation, les cellules ont été comptées et le pourcentage de croissance par rapport aux cellules non traitées a été calculé (**Figure 51**).

La cytotoxicité du composé augmente en fonction de la concentration, mais le pourcentage de croisance cellulaire n'est jamais inférieur à 50 % dans l'intervalle de concentrations étudiées. De plus, on n'observe pas de différence entre les cellules K562 et les cellules K562/ADR.

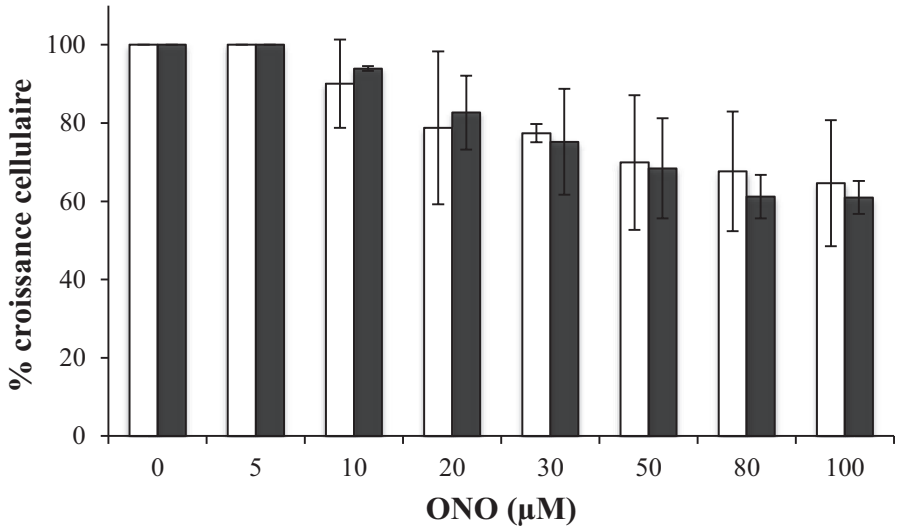


Figure 51 : Pourcentage de croissance cellulaire en fonction de la concentration d'ONO pour les cellules K562 (barres blanches) et K562/ADR (barres grises).

5.5.2 Etude de l'incorporation intracellulaire de l'ONO

L'incorporation intracellulaire de l'ONO a été mesurée par cytométrie de flux dans les cellules K562 et K562/ADR. Pour cela, les cellules, à une concentration de 10^6 cellules/ml, ont été incubées avec 20 µM d'ONO dans le tampon HEPES/Na^+ à 37 °C, en présence de 5 mM de glucose, et la fluorescence de cette molécule dans les cellules a été mesurée en fonction du temps. Les valeurs finales de fluorescence sont présentées en fonction du temps d'incubation avec l'ONO (**Figure 52**).

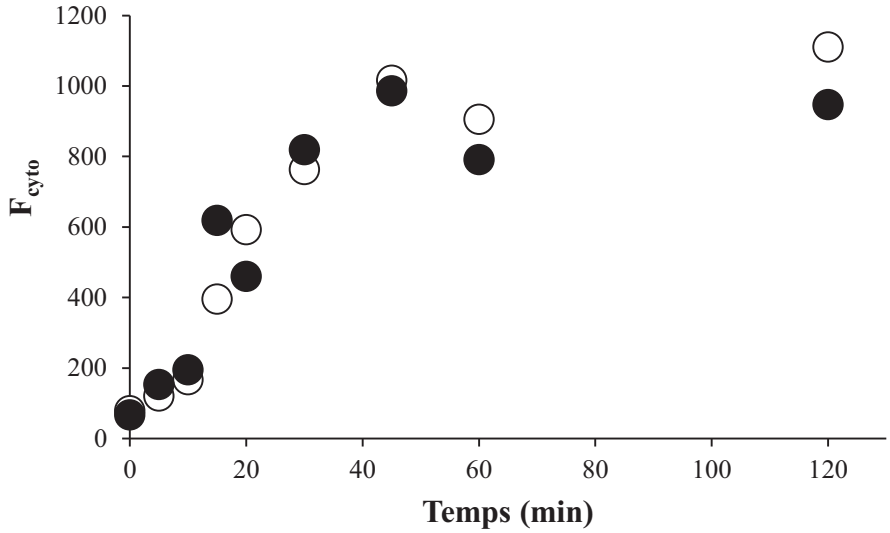


Figure 52 : Variation du signal F_{cyto} en fonction du temps dans les cellules K562 (cercles blancs) et K562/ADR (cercles noirs) incubées avec 20 µM d'ONO.

Lorsque les cellules sont incubées avec l'ONO, le signal F_{cyto} augmente en fonction du temps, ce qui suggére que le composé est capable de traverser la membrane plasmique et entrer dans les cellules. De plus, il n'existe pas de différence dans l'incorporation entre les cellules K562 et K562/ADR, ce que suggére également que cette molécule n'est pas substrat de la P-gp.

5.6 Etude de la cytotoxicité de l'ONO et du $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$ dans des cellules neuronales

La cytotoxicité de l'ONO et du $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$ a été étudiée sur la lignée cellulaire neuronale SH-SY5Y par deux méthodes : croissance cellulaire et viabilité cellulaire.

Concernant la croissance cellulaire, les cellules ont été mises en culture en présence de concentrations croissantes d'ONO et du $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$. Après trois jours d'incubation, les cellules ont été comptées et le pourcentage de croissance par rapport

aux cellules non traitées a été calculé. La croissance cellulaire a été aussi étudiée en présence du DMSO, solvant utilisé pour la préparation des solutions mères de molécules d'intérêt (**Figure 53**).

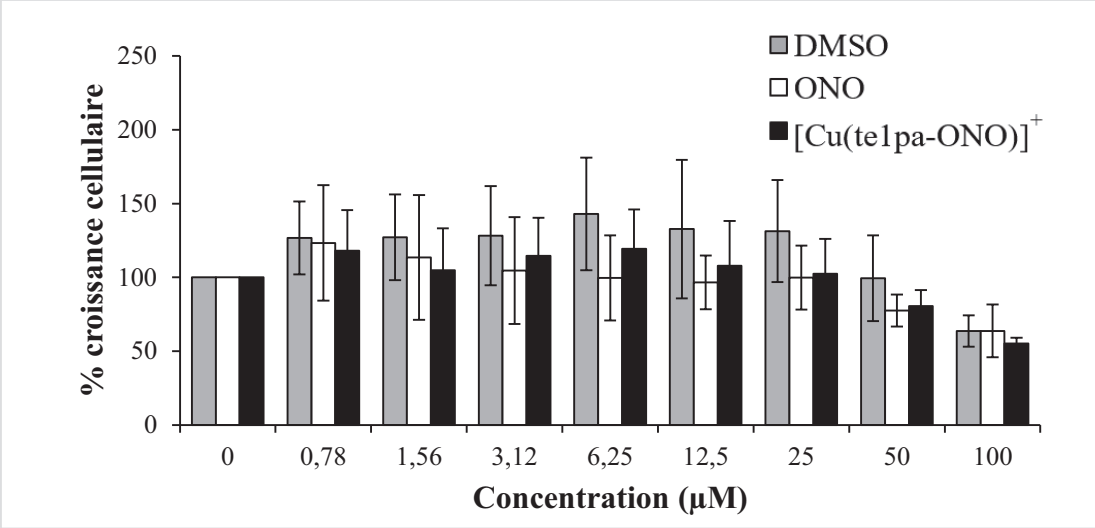


Figure 53 : Pourcentage de croissance cellulaire des cellules neuronales SH-SY5Y en fonction de la concentration de DMSO (barres grises), de l'ONO (barres blanches), et du [Cu(te1pa-ONO)]$^{+}$ (barres noires).

Les résultats obtenus montrent que la croissance cellulaire diminue à environ 65 % par rapport au témoin pour l'ONO, le [Cu(te1pa-ONO)]$^{+}$ et pour le DMSO à une concentration de 100 µM. L'absence de différence significative entre les composés testés et le DMSO suggère que cette inhibition de la croissance cellulaire peut être attribuée au DMSO.

La viabilité cellulaire a été évaluée par l'incorporation de l'iodure de propidium (IP) dans les cellules neuronales (**Figure 54**). La viabilité des cellules dans ces expériences est élevée, avec seulement environ 2 % des cellules marquées par l'IP lorsqu'on ajoute l'ONO à une concentration de 100 µM.

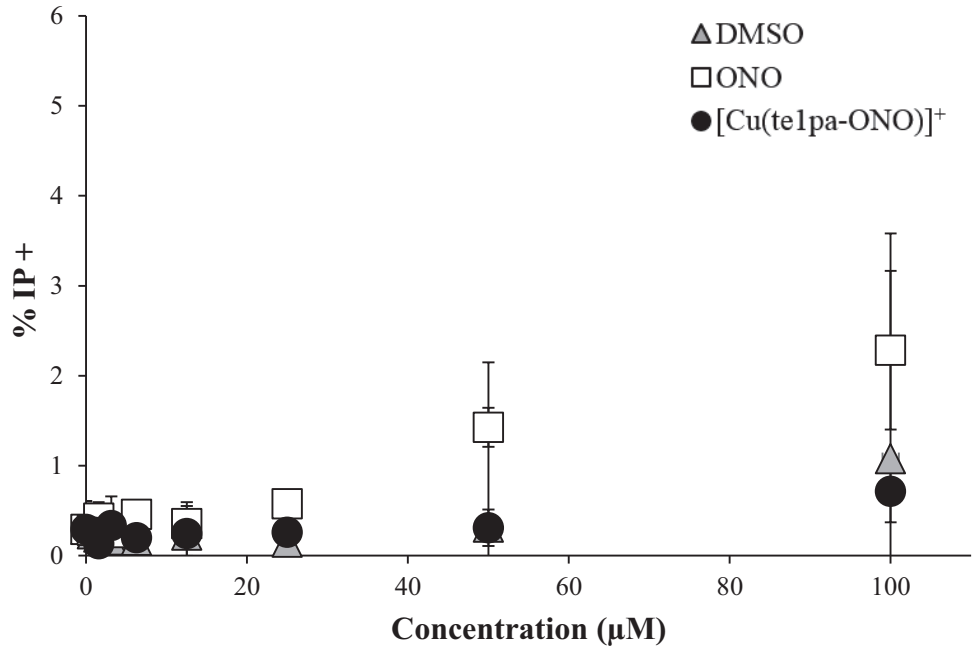


Figure 54 : Pourcentage de cellules SH-SY5Y marquées à l'iodure de propidium (% IP+) après traitement avec ONO, $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$ ou DMSO.

Les résultats obtenus lors des expériences de cytotoxicité sur des cellules neuronales permettent de suggérer que, dans les concentrations étudiées, ni l'ONO ni le $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$ sont peu toxiques pour les cellules neuronales.

5.7 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons décrit la synthèse de l'ONO, un marqueur des plaques amyloïdes, inspiré des protocoles d'Ono et collaborateurs (Ono *et al.*, 2010b), et la synthèse du complexe de cuivre $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$. Pour ce dernier, nous avons proposé une stratégie de synthèse basée sur la synthèse d'un bras picolinate fonctionnalisée avec deux groupes fonctionnels qui permettent le couplage postérieur avec le macrocycle protégé et avec l'ONO. Finalement, la déprotection du macrocycle, suivie par la complexation avec l'ion Cu^{2+}, a permis d'obtenir le complexe $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$.

Les expériences réalisées dans les cellules K562 et K562/ADR concernant l'incorporation de l'ONO et la cytotoxicité montrent que cette molécule est capable d'entrer dans les cellules et qu'elle est faiblement cytotoxique aux concentrations étudiées. Les résultats obtenus lors de ces expériences suggèrent également que l'ONO n'est pas un substrat de la P-gp et qu'il peut être un bon candidat pour la synthèse d'une molécule capable de traverser les membranes afin de cibler le peptide amyloïde.

Des expériences sur la cytotoxicité montrent que l'ONO et le [Cu(te1pa-ONO)]$^+$ sont faiblement toxiques pour les cellules neuronales au rang de concentrations étudiée.

Les résultats de nos travaux nous permettent penser à la possibilité de réaliser des travaux conduisant à un caractérisation plus approfondie du [Cu(te1pa-ONO)]$^+$, et notamment la réalisation d'expériences pour quantifier la détection des plaques amyloïdes in vitro, la mesure avec des modèles cellulaires de l'incorporation intracellulaire de ce complexe et le passage de la BHE, ou l'utilisation de modèles animaux de la maladie d'Alzheimer pour la quantification de sa biodistribution et son entrée dans le cerveau.

Dans le chapitre suivant nous décrivons les travaux réalisés en collaboration avec le groupe du Pr. Teodori à l'Università degli Studi de Firenze sur une série d'inhibiteurs de la P-gp, protéine présente au niveau de la BHE et dont l'inhibition pourrait conduire à l'amélioration de l'administration intracérébrale de molécules qui soient des substrats de cette protéine.

Chapitre 6.
Inhibiteurs de la P-gp

«Protip: don't stop climbing just because you reach the top»
Astuce : ne cesse pas de monter seulement parce que tu as atteint le sommet.

Randall Munroe, xkcd 1608: Hoverboard

6.1 L'inhibition de la P-gp dans la MDR

La contribution de la P-gp au phénomène de MDR peut entraîner l'échec de divers traitements anticancéreux. Plusieurs agents anticancéreux sont des substrats de la P-gp, ce qui diminue leur efficacité lorsque les cellules cancéreuses surexpriment cette protéine (Juliano et Ling, 1976 ; Gottesman *et al.*, 2002).

L'inhibition de la P-gp permettrait potentiellement d'améliorer l'administration d'agents thérapeutiques, notamment d'anticancéreux rendus inefficaces par la présence de cette protéine. Cet objectif peut être atteint (i) par obstruction du site actif, ce qui empêcherait la liaison des substrats, (ii) par le blocage du changement conformationnel qui donne lieu à la libération du substrat, (iii) par blocage de l'hydrolyse de l'ATP au niveau des NBDs, ou (iv) par altération de la stabilité de la membrane cellulaire (Ohnuma *et al*., 2011; Amin, 2013 ; Ma et Biggin, 2013 ; Loo et Clarke, 2015 ; Kadioglu *et al*., 2016).

Les molécules agissant comme inhibiteurs de la P-gp montrent des structures aussi bien diverses que les substrats (Amin, 2013). La complexité du site actif de la P-gp rend difficile l'utilisation de méthodes de modélisation moléculaire pour la conception de nouveaux inhibiteurs de la P-gp (Kadioglu *et al*., 2016). Pour cette raison, le développement de nouveaux inhibiteurs de la P-gp exige la synthèse et l'évaluation de séries de molécules, puis l'optimisation de celles qui sont plus efficaces (Teodori *et al*., 2010).

La plupart des inhibiteurs proposés dans la littérature possèdent dans leur structure des groupes aromatiques et des atomes d'azote basiques. Ils exercent leur fonction principalement au niveau du site actif (Teodori *et al*., 2010), cependant quelques inhibiteurs sont aussi capables d'interagir avec les NBDs (Ohnuma *et al*., 2011; Ma et Biggin, 2013).

Trois générations d'inhibiteurs de la P-gp ont été développés depuis les années 1980 (Thomas et Coley, 2003 ; Coley, 2010 ; Srivalli et Lakshmi, 2012 ; Amin, 2013). La première génération correspond à des molécules comme le vérapamil, la cyclosporine A, ou la vincristine. Ces composés sont des substrats de la P-gp et agissent comme des inhibiteurs compétitifs. La deuxième génération d'inhibiteurs apparait après la modification structurelle des composés de première génération pour optimiser l'inhibition de la P-gp, et réduire leur toxicité (Coley, 2010). Des exemples de cette deuxième génération sont le dexvérapamil, analogue du vérapamil, ou le valspodar, analogue de la cyclosporine A. Malgré l'amélioration de l'affinité pour la P-gp, la faible spécificité de ces inhibiteurs pour cette protéine persiste.

Ensuite, une troisième génération d'inhibiteurs fut développée avec l'utilisation de concepts provenant de la chimie combinatoire, et l'étude de la relation quantitative structure-activité (*quantitative structure-activity relationship*, QSAR) pour obtenir des molécules avec une plus forte spécificité vers cette protéine et, au même temps, une plus faible toxicité. Ces travaux ont donné lieu à la synthèse de plusieurs inhibiteurs, parmi lesquels l'exemple le plus représentatif est le tariquidar (**Figure 55**). Le tariquidar n'est pas un substrat de la P-gp. Il exerce sa fonction inhibitrice par blocage de la liaison entre le substrat et la protéine ou par inhibition de l'hydrolyse de l'ATP (Fox et Bates, 2007).

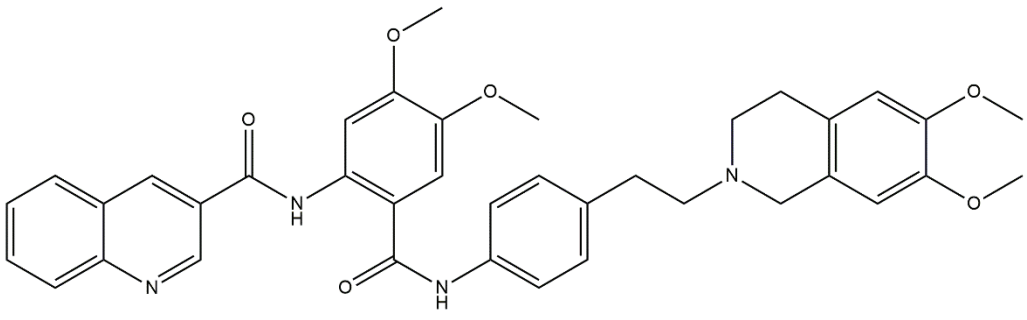


Figure 55 : Structure du tariquidar

L'efficacité des inhibiteurs est souvent quantifiée grâce à la constante de dissociation K_D. Dans le cadre de l'inhibition de la P-gp, la valeur de K_D obtenu pour le tariquidar est de ~ 5 nM, ce qui permet l'utilisation de doses très faibles de l'inhibiteur (Coley, 2010). A titre de comparaison, le vérapamil a une K_D ~ 500 nM (Ferry *et al*., 1995 ; Zhang *et al*., 2000).

Le tariquidar, comme d'autres inhibiteurs de la P-gp, a été testé dans des essais cliniques (Pusztai *et al.*, 2005 ; Coley, 2010 ; Dei *et al.*, 2014). A ce jour, tous les essais cliniques de phase III avec cette molécule ont échoué à cause de problèmes pharmacocinétiques et pharmacodynamiques associés à la toxicité de l'agent chimiothérapeutique, ou après n'avoir pas montré d'avantage thérapeutique (Colabufo *et al.*, 2010 ; Shaffer *et al.*, 2012). Par exemple, deux essais de phase III du tariquidar en co-administration avec les médicaments anti-tumoraux paclitaxel/carboplatin et vinorelbine, chez des patients ayant un cancer bronchique à petites cellules ont été arrêtés après l'apparition d'une toxicité excessive (Szakács *et al.,* 2006 ; Fox et Bates, 2007 ; Wu *et al.,* 2016).

Aujourd'hui, aucun de ces inhibiteurs n'a été approuvé pour l'utilisation clinique, ce qui fait du développement de nouveaux inhibiteurs de la P-gp un domaine de recherche avec un fort potentiel (Kim *et al.*, 2014 ; Fox *et al.*, 2015 ; Tomaru *et al.*, 2015).

6.2 Rôle de la P-gp dans la BHE

Dans les membranes des cellules endothéliales de la BHE et d'autres cellules de l'UNV, la P-gp et la BCRP jouent un rôle central dans le maintien de l'homéostasie du cerveau et la protection du SNC, car elles peuvent empêcher l'accès de nombreux agents exogènes dans le cerveau (Löscher et Potschka, 2005a ; Scherrmann, 2009 ; Abuznait et Kaddoumi, 2012).

La perméabilité restreinte de la BHE oblige à une reformulation des molécules afin de réduire leur poids moléculaire, réduire le nombre de groupes polaires, et augmenter leur lipophilie (Lipinski *et al.*, 2001). Cependant, l'augmentation de la lipophilie peut augmenter la probabilité que la molécule devienne un substrat des transporteurs ABC (Poongavanam *et al.*, 2012).

La P-gp est exprimée dans le côté luminale des cellules endothéliales de la BHE. Bien que des études du transcriptome et du proteome de microvaisseaux montrent que la concentration de BCRP dans les cellules endothéliales est plus élevée que celle de P-gp (Dauchy *et al*., 2008 ; Shawahna *et al*., 2011), le rôle de la P-gp au niveau de la BHE a été plus étudié que celui de la BCRP (Lee *et al*., 2007 ; Scherrmann, 2009). Cependant, la spécificité de ces deux protéines est similaire, et plusieurs substrats d'une protéine le sont aussi de l'autre.

L'activité de la P-gp au niveau de la BHE est un obstacle important pour le traitement de nombreuses maladies du cerveau. Des médicaments utilisés pour le traitement de maladies cérébrales comme l'épilepsie (Zhang *et al.*, 2012), la schizophrénie (Hoosain *et al.*, 2015), la dépression (De Klerk *et al.*, 2011), ou l'infection des microglies et astrocytes par le virus de l'immunodéficience humaine (Löscher et Potschka, 2005b ; Ronaldson *et al.*, 2008) sont substrats de la P-gp.

La P-gp affecte également la biodistribution de molécules utilisées pour traiter des maladies neurodégénératives. C'est le cas, par exemple, de plusieurs agonistes de la dopamine utilisés pour le traitement de la maladie de Parkinson (Bartels, 2011). Egalement, le donepezil et la galantamine, deux inhibiteurs de la cholinesterase utilisés cliniquement pour le traitement de la maladie d'Alzheimer sont considérés comme des substrats de la P-gp (Ishiwata *et al.*, 2007 ; Noetzli *et al.*, 2013 ; McEneny-King *et al.*, 2015).

Compte tenu de la présence de la P-gp au niveau de la BHE mais aussi dans les cellules cancéreuses de tumeurs cérébrales (Agarwal *et al.*, 2011 ; Azad *et al.*, 2015 ;

Geldenhuys *et al.*, 2015), des doses très élevées de l'agent chimiothérapeutique sont nécessaires pour obtenir un bénéfice thérapeutique, ce qui augmente le risque d'effets secondaires sévères (Geldenhuys *et al.*, 2015).

6.3 L'inhibition de la P-gp dans la BHE

L'inhibition de la P-gp au niveau de la BHE peut contribuer au passage vers le cerveau de médicaments substrats de cette protéine, permettant d'atteindre des concentrations efficaces du médicament au niveau du cerveau. Ce concept a été proposé dans la littérature pour augmenter la concentration intracérébrale de certains antidépresseurs et opioïdes (Letrent *et al.*, 1999 ; Ouyang *et al.*, 2009 ; O'Brien, 2013).

L'augmentation du rapport entre la concentration dans le cerveau et la concentration dans le sang associé à l'inhibition de l'activité d'efflux de la P-gp permettrait d'utiliser des doses de médicaments plus faibles et ainsi d'éviter des effets secondaires. De plus, l'inhibition de la P-gp élimine des problèmes liés à la variabilité interindividuelle de l'expression de cette protéine dans la BHE (Bartels, 2011 ; Amin, 2013).

Dans ce contexte, et pour contribuer au développement de nouveaux inhibiteurs de la P-gp qui pourraient être utilisés dans le cadre du traitement chimiothérapeutique ou pour le passage de médicaments ou d'agents d'imagerie médicale visant le cerveau, nous avons travaillé en collaboration avec l'équipe du Pr. Elisabetta Teodori afin d'étudier l'inhibition de la P-gp par de nouvelles molécules.

6.4 Molécules étudiées

Les molécules utilisées dans cette étude ont été développées à partir de la structure du vérapamil, des N'N-bis(alkanol)amine aryl esters et des bis(cyclohexanol)amine aryl esters montrant une forte capacité d'inhiber la P-gp dont leur activité a été déjà étudiée dans le cadre de notre collaboration avec cette équipe (Teodori *et al.*, 2007 ; Martelli *et al.*, 2011 ; Orlandi *et al.*, 2013 ; Dei *et al.*, 2014).

Encouragés par les résultats obtenus par les composés étudiés précédemment, une structure hybride entre les deux a été conçue, et une série de N-alkanol-N-cyclohexanol amine aryl esters a été synthétisée. Dans ces composés, les deux esters aromatiques sont liés à l'amine par deux espaceurs différents : (i) une chaine saturée de longueur variable, et (ii) un cycle rigide de six carbones. Deux stéréo-isomères (*cis* et *trans*) sont possibles grâce à la présence d'un centre stéréogène dans le cyclohexane.

Dans cette étude, six couples *cis* et *trans* ont été synthétisés, à partir de deux groupes aryl qui ont montré de bons résultats lors de travaux précédents : (E)-3-(3,4,5-triméthoxyphényl)vinyle (a) et 3,4,5-triméthoxyphényle (b) (**Figure 56**) (Orlandi *et al.*, 2013 ; Dei *et al.*, 2014). Chaque groupe fonctionnel aryl ester a été introduit dans le côté du cycle (Ar) ou dans le côté de la chaine saturée (Ar_1). Trois analogues avec des chaines saturées de longueur n = 3, 4, 5 ont été obtenus.

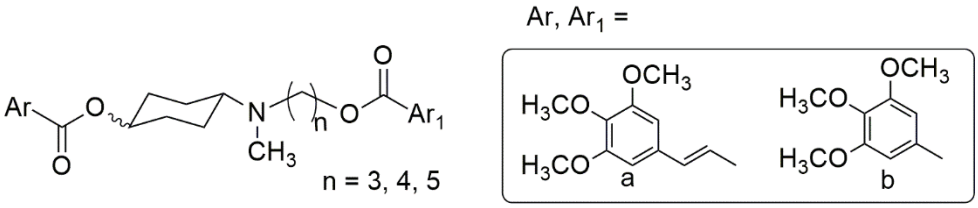


Figure 56 : Structure des composés étudiés.

L'inhibition de la P-gp par cette série de composés a été évaluée par des essais d'incorporation de la pirarubicine dans les cellules K562/ADR. L'effet des modifications de la structure des composés et l'impact de la stéréo-isomérie sur l'efficacité d'inhibition de la P-gp ont été étudiés en fonction de la concentration des différents inhibiteurs (entre 0 et 5 μM), sans varier la concentration de pirarubicine. Pendant les expériences, nous nous sommes assuré que les composés ne modifiaient pas la fluorescence de la pirarubicine. Le vérapamil, un inhibiteur de la P-gp de première génération, a été inclus comme référence.

6.5 Résultats et discussion

L'activité inhibitrice de chaque molécule a été exprimée en fonction du paramètre α, qui mesure la fraction d'inhibition calculée à partir des données de variation du signal fluorescent de la pirarubicine à $\lambda_{émission}$ = 580 nm ($\lambda_{excitation}$ = 490 nm). Le paramètre α varie entre 0 (absence d'inhibition) et 1 (inhibition totale). De même, nous avons calculé $[I]_{0,5}$ comme la concentration d'inhibiteur qui cause une augmentation du 50 % dans la concentration de pirarubicine dans le noyau. Ainsi, plus cette concentration est faible, plus l'inhibiteur est efficace.

Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 10**. On observe que tous les composés testés ont des valeurs de $[I]_{0,5}$ comprises entre 60 nM et 510 nM, indiquant qu'il possèdent une bonne activité inhibitrice de la P-gp. Ces valeurs sont inférieures, dans tous les cas, à celle du vérapamil, les valeurs étant de 3 à 27 fois plus petits que le $[I]_{0,5}$ du vérapamil. Dans tous les cas, sauf pour le composé 6b, les valeurs de α_{max} sont très proches de 1, ce qui montre que ces composés peuvent inhiber complètement le transport d'efflux associé à la P-gp. Pourtant, le complexe 6b a une valeur de α_{max} supérieur à celui du vérapamil.

Il existe, dans la plupart de couples, une préférence stéréochimique pour l'isomère *trans*, ce qui suggère que cette géométrie est plus propice à une meilleure interaction avec la P-gp. A l'exception du couple 5a et 5b, les isomères *trans* sont entre 3 et 7 fois plus actifs que les isomères *cis*. Le couple 5a et 5b montre une inhibition très efficace et similaire pour les deux isomères, avec des résultats qui ne sont pas significativement différentes.

De plus, les résultats obtenus dans le laboratoire du Pr. Teodori lors des expériences de modulation de la cytotoxicité de la doxorubicine et d'inhibition de l'efflux de la rhodamine 123 montrent que les isomères *trans* sont plus efficaces que les isomères *cis*, y compris dans le couple 5a et 5b.

Tableau 10 : Inhibition de l'activité de transport de la P-gp : concentrations des molécules inhibitrices lorsque α = 0,5 ($[I]_{0,5}$), et la fraction maximale d'inhibition obtenue (α_{max}).

	Composé	n	Ar	Ar_1	$[I]_{0,5}$ µM[a]	α_{max}[b]
FB10A ***cis***	**1a** *(cis)*	**3**	**a**	**b**	0,47±0,11	0,99±0,01
FB10B ***trans***	**1b** *(trans)*	**3**	**a**	**b**	0,07±0,01	0,99±0,01
FRA120A ***cis***	**2a** *(cis)*	**3**	**b**	**a**	0,25±0,03	0,99±0,01
FRA120B ***trans***	**2b** *(trans)*	**3**	**b**	**a**	0,08±0,02	0,99±0,01
FRA126A ***cis***	**3a** *(cis)*	**4**	**a**	**b**	0,29±0,12	0,99±0,01
FRA126B ***trans***	**3b** *(trans)*	**4**	**a**	**b**	0,06±0,01	0,99±0,01
FRA123A ***cis***	**4a** *(cis)*	**4**	**b**	**a**	0,35±0,13	0,99±0,01
FRA123B ***trans***	**4b** *(trans)*	**4**	**b**	**a**	0,08±0,01	0,99±0,01
ELF26A ***cis***	**5a** *(cis)*	**5**	**a**	**b**	0,09±0,03	0,96±0,04
ELF26B ***trans***	**5b** *(trans)*	**5**	**a**	**b**	0,13±0,05	0,98±0,02
ELF34A ***cis***	**6a***(cis)*	**5**	**b**	**a**	0,51±0,03	0,98±0,14
ELF34B ***trans***	**6b** *(trans)*	**5**	**b**	**a**	0,10±0,01	0,83±0,06
	vérapamil				1,6±0,30	0,70±0,07

L'augmentation de la longueur de la chaine ne montre pas de variations substantielles de l'inhibition pour les isomères *trans*. Cependant, pour les isomères *cis* on trouve deux tendances opposées en fonction de la position des groupes aryle. Dans les composés 1a, 3a et 5a, qui ont le groupe aryle vinyle (a) dans le côté rigide de la molécule, l'augmentation de la longueur de la chaine saturée amène à une augmentation de l'efficacité de l'inhibition. Par contre, dans les composés 2a, 4a et 6a, dans lesquels le groupe (a) est dans le côté flexible, l'augmentation du nombre de carbones est corrélée avec une réduction de l'inhibition. On peut conclure que, au moins pour les isomères *cis*, la longueur de la chaine saturée module l'interaction avec la P-gp.

Des essais de stabilité chimique réalisés dans le laboratoire du Pr. Teodori ont montré que la dégradation des composés dans le tampon PBS ou dans le sérum de veau est négligeable, mais les composés 1b, 2a, 2b, 3b et 4b montrent une dégradation enzymatique dans le plasma humain pour donner l'alcool alkylique. Dans tous les cas, l'hydrolyse a lieu de préférence sur l'ester alkanol aryle. Dans le plasma humain, les composés avec une chaine saturée plus longue sont plus stables que ceux avec une chaine saturée plus courte. Egalement, il existe une préférence stéréochimique de l'hydrolyse vers les isomères *trans*.

En conclusion, les résultats obtenus dans cette étude signalent le composé 5b comme le meilleur candidat pour continuer la recherche de nouveaux inhibiteurs de la P-gp. Le composé 5b, ayant une forte efficacité comme inhibiteur de la P-gp et une grande stabilité dans le plasma humain, est une molécule qui pourrait être testée *in vivo*. Les inhibiteurs de la P-gp pourraient être optimisés avec l'utilisation de différentes structures aromatiques, différentes longueurs de chaîne, ou des différents substituants. L'évaluation des propriétés d'inhibition de l'activité de la P-gp de ces molécules permettra d'optimiser la structure chimique de ces inhibiteurs et comprendre mieux l'importance des différents paramètres vers leur capacité à inhiber la P-gp.

Conclusions

Cette thèse de doctorat s'inscrit dans le contexte de la recherche de complexes métalliques utilisables en imagerie médicale, capables de marquer les plaques amyloïdes dans le cerveau humain afin de contribuer au diagnostic de la maladie d'Alzheimer.

La détection des plaques amyloïdes au niveau cérébral nécessite l'entrée des molécules dans le cerveau à travers la BHE. Les méthodes d'administration intracrânienne de médicaments étant invasives et locales, ils ne permettent pas une diffusion globale des molécules dans tout le cerveau. Dans la BHE, le transport paracellulaire est généralement interdit à cause de la présence des jonctions serrées présentes entre les cellules endothéliales. Par conséquent, le transport de molécules s'effectue par la voie transcellulaire, c'est-à-dire, à travers les cellules endothéliales. La présence de transporteurs d'efflux, comme la P-gp, peut diminuer l'entrée dans le cerveau des composés qui sont des substrats de ces protéines.

Les complexes $[Cu(te1pa)]^+$ et $[Eu(do2pa)]^+$, développés par l'équipe du Pr. Raphael Tripier à l'Université de Bretagne Occidentale, ont été les composés de départ de nos recherches. Leurs ligands, te1pa et do2pa, se basent sur les tetraazamacrocycles cyclam et cyclen et présentent un ou deux groupes picolinates, respectivement.

Nous avons commencé nos recherches par l'évaluation du transport intracellulaire et la cytotoxicité des complexes $[Cu(te1pa)]^+$ et $[Eu(do2pa)]^+$ sur les cellules K562 et K562/ADR. Le complexe de cuivre montre une cytotoxicité faible, mais statistiquement significative à partir de 200 µM. Au contraire, aucune cytotoxicité n'a été détectée pour $[Eu(do2pa)]^+$.

Les deux complexes sont capables de traverser la membrane plasmique et de pénétrer à l'intérieur des cellules, montrant un rapport entre la concentration

intracellulaire et la concentration extracellulaire de 1,4 et de 5, respectivement. Aucune différence significative concernant l'accumulation intracellulaire n'a été trouvée entre les cellules K562 et K562/ADR, ce qui suggère que ces composés ne sont pas des substrats de la P-gp. Ces résultats suggèrent que ces deux complexes possèdent des structures qui pourraient être appropriés à la production d'agents d'imagerie visant des processus intracellulaires.

Après l'étude du transport intracellulaire des complexes métalliques, nous avons envisagé la synthèse d'un complexe dérivé du $[Cu(te1pa)]^{+}$, qui viserait les plaques amyloïdes grâce à sa liaison avec une molécule connue comme marqueur de ces plaques. Pour cela, nous avons couplé à l'atome 4 du picolinate du te1pa, un marqueur des plaques amyloïdes dérivé de l'aryl-benzofuranne, l'ONO. Ainsi, nous avons synthétisé un dérivé de picolinate avec un atome de chlore dans la position désirée, et en plus un atome de chlore lié au méthylène de la position 6 du picolinate, par lequel le macrocycle cyclam a été N-fonctionnalisé après protection des trois amines avec un groupe phosphoryle. Ensuite, une réaction de Buchwald-Hartwig permet le couplage entre l'amine de l'ONO et le picolinate. Après hydrolyse de l'ester et déprotection du macrocycle en milieu acide, le ligand final te1pa-ONO a été obtenu. Sa réaction avec le Cu^{2+} a permis d'obtenir le complexe désiré $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^{+}$.

Avant de faire la synthèse du complexe [Cu(te1pa-ONO)]+, nous avons étudié, dans les cellules K562 et K562/ADR, la cytotoxicité et l'incorporation intracellulaire de l'ONO. Nous avons observé une inhibition de la croissance cellulaire d'environ 50 % à 100 μM, ce qui représente une concentration relativement élevée. L'ONO est aussi capable de s'incorporer à l'intérieur de ces cellules. Il est important de remarquer qu'il n'existe pas de différence d'incorporation entre les deux lignées cellulaires, ce qui suggère que ce composé n'est pas un substrat de la P-gp. Lors de ces essais aucune toxicité n'a été observée.

Nous avons obtenu les spectres d'absorption dans l'UV-visible et le spectre d'émission de fluorescence pour l'ONO et pour le $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^{+}$. L'ONO

présente un maximum d'absorption à 325 nm avec un coefficient d'extinction molaire de 8560 $M^{-1}.cm^{-1}$ dans l'eau, tandis que $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^{+}$ montre un pic à 345 nm, avec un coefficient d'extinction molaire de 4624,3 $M^{-1}.cm^{-1}$ dans l'eau. Après excitation aux longueurs d'onde indiquées, l'ONO a un pic d'émission à 410 nm avec un rendement quantique de 0,05. Par contre, le spectre du complexe $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^{+}$ ne présente, à la même longueur d'onde, qu'un pic de très faible intensité de rendement quantique environ 1400 fois plus faible que celui de l'ONO.

Des tests de cytotoxicité de deux composés ont été efectués sur des cellules neuronales d'origine humaine, les cellules SH-SY5Y. Nos résultats montrent une inhibition de la croissance cellulaire à des concentrations élevées de 50 ou 100 µM. A cette dernière concentration, l'inhibition de la croissance cellulaire est réduite à environ 65 % par rapport au témoin pour les deux molécules mais aussi pour le contrôle avec le DMSO, ce qui suggère que le solvant pourrait être à l'origine de ce phénomène.

La P-gp est une protéine impliquée dans la MDR. Ce phénomène est un facteur majeur dans l'échec de nombreuses formes de chimiothérapie. En plus des cellules cancéreuses, la P-gp est physiologiquement exprimée dans de nombreux organes du corps humain, parmi lesquels se trouve le cerveau. Son expression au niveau de la BHE joue un rôle important dans l'excrétion des métabolites et des xénobiotiques qui pourraient endommager le cerveau, mais elle limite aussi la pénétration de médicaments vers le cerveau. Son inhibition pourrait permettre de diminuer la MDR et par ailleurs pourrait contribuer à l'entrée de médicaments dans le cerveau.

Dans ce contexte, nous avons étudié l'activité d'une série de N-alkanol-N-cyclohexanol amine aryl esters synthétisés dans le but de trouver de nouveaux inhibiteurs de la P-gp. Dans ces composés, les deux esters aromatiques sont liés à l'amine par deux espaceurs différents : (i) une chaine saturée de longueur variable, et (ii) un cycle rigide de six carbones. Etant donné la présence du cyclohexane, deux stéréo-isomères (*cis* et *trans*) sont possibles.

Tous les composés testés ont des valeurs de $[I]_{0,5}$ comprises entre 60 nM et 510 nM, indiquant qu'ils possèdent une bonne activité inhibitrice de la P-gp, les valeurs étant de 3 à 27 fois plus faibles que le $[I]_{0,5}$ du vérapamil. En général, il existe une préférence stéréochimique, et l'isomère *trans* montre un pouvoir d'inhibition plus important que l'isomère *cis*. A l'exception du couple 5a et 5b, les isomères *trans* sont entre 3 et 7 fois plus actifs que les isomères *cis*. Le couple 5a et 5b montre un pouvoir d'inhibition important et similaire pour les deux isomères, avec des résultats qui ne sont pas significativement différents.

L'augmentation de la longueur de la chaine n'entraîne pas de variations substantielles en termes d'inhibition de la P-gp pour les isomères *trans*. Cependant, pour les isomères *cis* on trouve deux tendances opposées en fonction de la position des groupes aryle. Dans les composés 1a, 3a et 5a, qui ont le groupe aryle vinyle (a) dans le côté rigide de la molécule, l'augmentation de la longueur de la chaine saturée amène à une augmentation de l'efficacité de l'inhibition. Par contre, dans les composés 2a, 4a et 6a, dans lesquels le groupe (a) est dans le côté flexible, l'augmentation du nombre de carbones est corrélée avec une réduction de l'inhibition. On peut conclure que, au moins pour les isomères *cis*, la longueur de la chaine saturée est un paramètre important qui module l'interaction avec le site actif de la P-gp.

Perspectives

En général, les symptômes de la maladie d'Alzheimer apparaissent après 65 ans, et la prévalence de la maladie augmente fortement avec l'âge. Le vieillissement de la population mondiale laisse penser que la maladie d'Alzheimer pourrait être un des problèmes socio-économiques les plus importants dans un futur proche.

Les efforts de recherche réalisés pendant les dernières décennies n'ont pas permis de produire un médicament capable de prévenir ou soigner la maladie. Il existe plusieurs médicaments qui permettent de faire un traitement symptomatique ou de ralentir la progression de la maladie, mais ils ne sont pas capables d'arrêter complètement le déclin cognitif.

Afin de lutter contre la maladie d'Alzheimer, il semble nécessaire d'améliorer les connaissances scientifiques liées à l'évolution de la maladie. L'observation avec des techniques d'imagerie médicale de la présence du peptide amyloïde au niveau cérébral pourrait permettre d'étudier plus profondément l'interconnexion entre ce peptide, la neurodégénérescence, et le déclin cognitif. De plus, les techniques d'imagerie peuvent contribuer au diagnostic de la maladie d'Alzheimer chez des individus qui ne manifestent pas encore de déclin cognitif, c'est-à-dire, chez des personnes dans le stade préclinique de la maladie.

L'utilisation de complexes métalliques, par exemple à base de ^{64}Cu, pourrait permettre l'emploi de radionucléides dont la demi-vie est supérieure à ceux actuellement utilisés pour la détection des plaques amyloïdes. Par ailleurs, des complexes de gadolinium pour l'IRM pourraient aussi être utilisés dans le cadre du diagnostic de la maladie.

Cependant, les ligands complexant ces métaux doivent être optimisés en termes de stabilité, coût, facilité de synthèse et dérivatisation avec des structures capables de détecter le peptide amyloïde, et capacité à pénétrer dans le cerveau.

Nous avons observé que les complexes $[Cu(te1pa)]^+$ et $[Eu(do2pa)]^+$, et l'ONO sont capables d'entrer dans les cellules K562 et K562/ADR. Nos résultats suggèrent qu'ils sont capables de s'incorporer à l'intérieur des cellules et qu'ils ne sont pas substrats de la P-gp.

A partir de ces résultats, et en utilisant comme base le $[Cu(te1pa)]^+$, nous avons entrepris la synthèse d'une nouvelle molécule qui pourrait potentiellement être utilisée pour la détection de plaques amyloïdes dans le cerveau en utilisant la TEP. La synthèse du complexe $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$ a été une réussite, mais certains aspects de cette synthèse doivent être améliorées afin d'augmenter le rendement.

Par ailleurs, ce travail ouvre la possibilité d'envisager la synthèse d'autres complexes mais avec de molécules capables de reconnaître les formes oligomériques du peptide amyloïde, comme par exemple l'ANS (Bolognesi *et al.,* 2010). De même, on peut envisager la synthèse d'une molécule analogue au $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$ basée sur le $[Gd(do2pa)]^+$, pour une utilisation éventuelle en IRM. Ce complexe pourrait être synthétisé par la fonctionnalisation successive du tétraazamacrocycle protégé avec un bras picolinate non modifié et le bras picolinate dérivé avec un atome de chlore utilisé dans la synthèse du $[Cu(te1pa\text{-}ONO)]^+$ (**5**).

Dans le cadre du développement de la molécule déjà synthétisée ou d'autres molécules qui pourraient être synthétisées, il est nécessaire d'évaluer sa capacité à traverser la BHE et de comprendre le mécanisme de transport subjacent. Ainsi, des études de transport dans de modèles de la BHE pourraient être envisagées.

On pourrait envisager de réaliser des expériences avec le complexe [Cu(te1pa-ONO)]$^{+}$ avec des modèles *in vitro* de la BHE (Gosselet *et al*., 2013), qui (i) reproduisent les caractéristiques fondamentales de la BHE comme l'absence de transport paracellulaire ; (ii) montrent la morphologie et physiologie typique des cellules endothéliales de la BHE ; (iii) respectent l'expression des transporteurs et récepteurs ; et (iv) sont pratiques et reproductibles d'un point de vue expérimental (Gosselet *et al*., 2013).

Notamment, on pourrait proposer l'utilisation de la lignée de cellules endothéliales humaines hCMEC/D3, dérivée de cellules extraites des microvaisseaux sanguins d'une femme adulte avec épilepsie. La représentativité de ce modèle de la BHE pourrait être améliorée grâce à une co-culture avec des astrocytes ou l'ajout de facteurs solubles appropriés induisant des caractéristiques de barrière plus proches à celles de la BHE.

Il est aussi possible d'étudier le passage de la BHE en utilisant des modèles animaux *in vivo*. Dans notre cas, on pourrait envisager d'utiliser des souris transgéniques modèles de la maladie d'Alzheimer comme les souris APP23 ou Tg2576. Ceci permettrait de caractériser l'incorporation intracérébrale au même temps que la détection in vivo des plaques amyloïdes, ainsi que la biodistribution de ces complexes en utilisant la forme active en imagerie médicale des complexes, c'est-à-dire, le complexe marqué au radioisotope ^{64}Cu dans le cadre d'une collaboration avec un laboratoire spécialisé, ou en mesurant la concentration de cuivre dans les différents organes des animaux traités avec les complexes. La visualisation de plaques amyloïdes pourrait aussi être investiguée sur des coupes de cerveaux humains de patients décédés souffrant d'Alzheimer.

Un des aspects les plus importants de la BHE est la présence des protéines d'efflux comme la P-gp, qui peuvent empêcher l'entrée au cerveau de molécules à visée diagnostique ou thérapeutique. Des nouveaux inhibiteurs efficaces de la P-gp pourraient être ainsi utilisés en clinique afin de diminuer la MDR, dans laquelle cette protéine est impliquée.

Egalement, l'utilisation clinique de ces composés pourrait être envisagée afin d'améliorer l'entrée au cerveau de médicaments qui soient des substrats de la P-gp, comme ceux aujourd'hui utilisés pour le traitement de pathologies cérébrales, y compris ceux utilisés dans la maladie d'Alzheimer. On pourrait aussi utiliser ces inhibiteurs efficaces de la P-gp dans le cadre des expériences de transport et de cytotoxicité sur les complexes, pour permettre de confirmer qu'il n'existe pas d'influence de la P-gp sur ces processus.

Ainsi que pour les complexes métalliques, les séries d'inhibiteurs de la P-gp devraient être améliorés avec l'utilisation de différentes structures aromatiques, différentes longueurs de chaîne, ou des différents substituants. L'évaluation des propriétés d'inhibition de l'activité de la P-gp de ces molécules permettra d'optimiser la structure chimique de ces inhibiteurs et comprendre mieux l'importance des différents paramètres vers leur capacité à inhiber la P-gp.

Bibliographie

Abbott, N.J. (2013). Blood–brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. J. Inherit. Metab. Dis. 36, 437–449.

Abbott, N.J., Rönnbäck, L., et Hansson, E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. Nat. Rev. Neurosci. 7, 41–53.

Abuznait, A.H., et Kaddoumi, A. (2012). Role of ABC transporters in the pathogenesis of Alzheimer's disease. ACS Chem. Neurosci. 3, 820–831.

Adlard, P.A., Tran, B.A., Finkelstein, D.I., Desmond, P.M., Johnston, L.A., Bush, A.I., et Egan, G.F. (2014). A review of β-amyloid neuroimaging in Alzheimer's disease. Brain Imaging Methods 8, 327.

Agarwal, S., Hartz, A.M.S., Elmquist, W.F., et Bauer, B. (2011). Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in brain cancer: two gatekeepers team up. Curr. Pharm. Des. 17, 2793–2802.

Aime, S., et Caravan, P. (2009). Biodistribution of gadolinium-based contrast agents, including gadolinium deposition. J. Magn. Reson. Imaging JMRI 30, 1259–1267.

Aime, S., Cabella, C., Colombatto, S., Geninatti Crich, S., Gianolio, E., et Maggioni, F. (2002). Insights into the use of paramagnetic Gd(III) complexes in MR-molecular imaging investigations. J. Magn. Reson. Imaging 16, 394–406.

Albert, M.S., DeKosky, S.T., Dickson, D., Dubois, B., Feldman, H.H., Fox, N.C., Gamst, A., Holtzman, D.M., Jagust, W.J., Petersen, R.C., *et al.* (2011). The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. 7, 270–279.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., et Walter, P. (2007). Molecular biology of the cell (Garland Science).

Aller, S.G., Yu, J., Ward, A., Weng, Y., Chittaboina, S., Zhuo, R., Harrell, P.M., Trinh, Y.T., Zhang, Q., Urbatsch, I.L., *et al.* (2009). Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. Science 323, 1718–1722.

Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. Allg. Z. Psychiatr. Psych.-Gerichtl. Med. 64, 146–148.

Alzheimer's Association (2015). 2015 Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimers Dement. 11, 332–384.

American Psychiatric Association (2013). Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-5 (Arlington, VA).

Amin, M.L. (2013). P-glycoprotein inhibition for optimal drug delivery. Drug Target Insights 7, 27–34.

Amiri, H., Srinivas, M., Veltien, A., van Uden, M.J., de Vries, I.J.M., et Heerschap, A. (2015). Cell tracking using (19)F magnetic resonance imaging: technical aspects and challenges towards clinical applications. Eur. Radiol. 25, 726–735.

Anderson, C.J., Dehdashti, F., Cutler, P.D., Schwarz, S.W., Laforest, R., Bass, L.A., Lewis, J.S., et McCarthy, D.W. (2001). 64Cu-TETA-octreotide as a PET imaging agent for patients with neuroendocrine tumors. J. Nucl. Med. 42, 213–221.

Andreasen, N., et Zetterberg, H. (2008). Amyloid-related biomarkers for Alzheimer's disease. Curr. Med. Chem. 15, 766–771.

Annaert, P.P., Turncliff, R.Z., Booth, C.L., Thakker, D.R., et Brouwer, K.L. (2001). P-glycoprotein-mediated in vitro biliary excretion in sandwich-cultured rat hepatocytes. Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem. 29, 1277–1283.

Anoop, A., Singh, P.K., Jacob, R.S., et Maji, S.K. (2010). CSF biomarkers for Alzheimer's disease diagnosis. Int. J. Alzheimers Dis. 2010, 606802.

Arispe, N., Rojas, E., et Pollard, H.B. (1993). Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 567–571.

Arispe, N., Pollard, H.B., et Rojas, E. (1994). β-amyloid Ca2+-channel hypothesis for neuronal death in Alzheimer Disease. Mol. Cell. Biochem. 140, 119–125.

Armarego, W.L.F., et Chai, C.L.L. (2003). Purification of Laboratory Chemicals (Butterworth-Heinemann).

Armulik, A., Genové, G., Mäe, M., Nisancioglu, M.H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L., Norlin, J., Lindblom, P., Strittmatter, K., *et al.* (2010). Pericytes regulate the blood-brain barrier. Nature 468, 557–561.

Assema, D.M.E. van, Lubberink, M., Bauer, M., Flier, W.M. van der, Schuit, R.C., Windhorst, A.D., Comans, E.F.I., Hoetjes, N.J., Tolboom, N., Langer, O., *et al.* (2012). Blood–brain barrier P-glycoprotein function in Alzheimer's disease. Brain 135, 181–189.

Attems, J., et Jellinger, K.A. (2014). The overlap between vascular disease and Alzheimer's disease - lessons from pathology. BMC Med. 12, 206.

Azad, T.D., Pan, J., Connolly, I.D., Remington, A., Wilson, C.M., et Grant, G.A. (2015). Therapeutic strategies to improve drug delivery across the blood-brain barrier. Neurosurg. Focus 38, E9.

Babić, M., Svob Štrac, D., Mück-Šeler, D., Pivac, N., Stanić, G., Hof, P.R., et Simić, G. (2014). Update on the core and developing cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer disease. Croat. Med. J. 55, 347–365.

Baguley, B.C. (2010). Multiple drug resistance mechanisms in cancer. Mol. Biotechnol. 46, 308–316.

Bailly, M., Ribeiro, M.J.S., Vercouillie, J., Hommet, C., Gissot, V., Camus, V., et Guilloteau, D. (2015). 18F-FDG and 18F-florbetapir PET in clinical practice: regional analysis in mild cognitive impairment and Alzheimer disease. Clin. Nucl. Med. 40, e111-116.

Balducci, C., et Forloni, G. (2014). In vivo application of beta amyloid oligomers: a simple tool to evaluate mechanisms of action and new therapeutic approaches. Curr. Pharm. Des. 20, 2491–2505.

Baltes, C., Princz-Kranz, F., Rudin, M., et Mueggler, T. (2011). Detecting amyloid-β plaques in Alzheimer's disease. Dans Magnetic Resonance Neuroimaging, M. Modo, et J.W.M. Bulte, éds. (Humana Press), pp. 511–533.

Banthia, S., et Samanta, A. (2002). Photophysical and transition-metal ion signaling behavior of a three-component system comprising a cryptand moiety as the receptor. J. Phys. Chem. B 106, 5572–5577.

Barbu, E., Molnàr, É., Tsibouklis, J., et Górecki, D.C. (2009). The potential for nanoparticle-based drug delivery to the brain: overcoming the blood–brain barrier. Expert Opin. Drug Deliv. 6, 553–565.

Barge, A., Cravotto, G., Gianolio, E., et Fedeli, F. (2006). How to determine free Gd and free ligand in solution of Gd chelates. A technical note. Contrast Media Mol. Imaging 1, 184–188.

Bartels, A.L. (2011). Blood-brain barrier P-glycoprotein function in neurodegenerative disease. Curr. Pharm. Des. 17, 2771–2777.

Bello, I., et Salerno, M. (2015). Evidence against a role of P-glycoprotein in the clearance of the Alzheimer's disease Aβ1-42 peptides. Cell Stress Chaperones 20, 421–430.

Benveniste, H., Einstein, G., Kim, K.R., Hulette, C., et Johnson, G.A. (1999). Detection of neuritic plaques in Alzheimer's disease by magnetic resonance microscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 14079–14084.

Bettens, K., Sleegers, K., et Van Broeckhoven, C. (2013). Genetic insights in Alzheimer's disease. Lancet Neurol. 12, 92–104.

Bickel, U. (2005). How to measure drug transport across the blood-brain barrier. NeuroRx 2, 15–26.

Bielschowsky, M. (1902). Die Silberimpragnation der Achsenzylinder. Neurol. Zentralblatt Leipz. 13, 579–584.

Blazquez-Llorca, L., Merchán-Pérez, Á., Rodríguez, J.-R., Gascón, J., et DeFelipe, J. (2013). FIB/SEM technology and Alzheimer's disease: three-dimensional analysis of human cortical synapses. J. Alzheimers Dis. 34, 995–1013.

Blennow, K., de Leon, M.J., et Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. Lancet 368, 387–403.

Blennow, K., Zetterberg, H., et Fagan, A.M. (2012). Fluid biomarkers in Alzheimer disease. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2, a006221.

Bloom, G.S. (2014). Amyloid-β and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. JAMA Neurol. 71, 505–508.

Bolognesi, B., Kumita, J.R., Barros, T.P., Esbjorner, E.K., Luheshi, L.M., Crowther, D.C., Wilson, M.R., Dobson, C.M., Favrin, G., et Yerbury, J.J. (2010). ANS binding reveals common features of cytotoxic amyloid species. ACS Chem. Biol. 5, 735–740.

Bonnet, C.S., et Tóth, É. (2016). Molecular magnetic resonance imaging probes based on Ln3+ complexes. Adv. Inorg. Chem. 68, 43–96.

Borel, A., Helm, L., et Merbach, A.E. (2001). Molecular dynamics simulations of MRI-relevant Gd(III) chelates: direct access to outer-sphere relaxivity. Chem. – Eur. J. 7, 600–610.

Bort, G., Catoen, S., Borderies, H., Kebsi, A., Ballet, S., Louin, G., Port, M., et Ferroud, C. (2014). Gadolinium-based contrast agents targeted to amyloid aggregates for the early diagnosis of Alzheimer's disease by MRI. Eur. J. Med. Chem. 87, 843–861.

Braak, H., et Braak, E. (1991). Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathol. (Berl.) 82, 239–259.

Braak, H., et Braak, E. (1995). Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. Neurobiol. Aging 16, 271–278.

Brookmeyer, R., Johnson, E., Ziegler-Graham, K., et Arrighi, H.M. (2007). Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. 3, 186–191.

Brookmeyer, R., Evans, D.A., Hebert, L., Langa, K.M., Heeringa, S.G., Plassman, B.L., et Kukull, W.A. (2011). National estimates of the prevalence of Alzheimer's disease in the United States. Alzheimers Dement. 7, 61–73.

Burgmans, S., van de Haar, H.J., Verhey, F.R.J., et Backes, W.H. (2013). Amyloid-β interacts with blood-brain barrier function in dementia: a systematic review. J. Alzheimers Dis. 35, 859–873.

Cabbiness, D.K., et Margerum, D.W. (1969). Macrocyclic effect on the stability of copper(II) tetramine complexes. J. Am. Chem. Soc. 91, 6540–6541.

Cacheris, W.P., Quay, S.C., et Rocklage, S.M. (1990). The relationship between thermodynamics and the toxicity of gadolinium complexes. Magn. Reson. Imaging 8, 467–481.

Camus, N., Halime, Z., Bris, N. le, Bernard, H., Beyler, M., Platas-Iglesias, C., et Tripier, R. (2015). A [two-step/one week] synthesis of C-functionalized homocyclens and cyclams. Application to the preparation of conjugable BCAs without chelating properties alteration. RSC Adv. 5, 85898–85910.

Caravan, P. (2006). Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium based MRI contrast agents. Chem. Soc. Rev. 35, 512–523.

Caravan, P., Ellison, J.J., McMurry, T.J., et Lauffer, R.B. (1999). Gadolinium(iii) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics, and applications. Chem. Rev. 99, 2293–2352.

Caroli, A., Prestia, A., Wade, S., Chen, K., Ayutyanont, N., Landau, S.M., Madison, C.M., Haense, C., Herholz, K., Reiman, E.M., *et al.* (2015). Alzheimer disease biomarkers as outcome measures for clinical trials in MCI. Alzheimer Dis. Assoc. Disord. 29, 101–109.

Cerasoli, E., Ryadnov, M.G., et Austen, B.M. (2015). The elusive nature and diagnostics of misfolded Aβ oligomers. Front. Chem. 1, 17.

Chen, G., Ward, B.D., Xie, C., Li, W., Wu, Z., Jones, J.L., Franczak, M., Antuono, P., et Li, S.-J. (2011). Classification of Alzheimer Disease, Mild Cognitive Impairment, and Normal Cognitive Status with Large-Scale Network Analysis Based on Resting-State Functional MR Imaging. Radiology 259, 213–221.

Chen, Z., Shi, T., Zhang, L., Zhu, P., Deng, M., Huang, C., Hu, T., Jiang, L., et Li, J. (2016). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: a review of the past decade. Cancer Lett. 370, 153–164.

Cheng, I.H., Scearce-Levie, K., Legleiter, J., Palop, J.J., Gerstein, H., Bien-Ly, N., Puoliväli, J., Lesné, S., Ashe, K.H., Muchowski, P.J., *et al.* (2007). Accelerating amyloid-β fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models. J. Biol. Chem. 282, 23818–23828.

Cheng, Y., Ono, M., Kimura, H., Kagawa, S., Nishii, R., et Saji, H. (2010). A novel 18F-labeled pyridyl benzofuran derivative for imaging of β-amyloid plaques in Alzheimer's brains. Bioorg. Med. Chem. Lett. 20, 6141–6144.

Chételat, G., La Joie, R., Villain, N., Perrotin, A., de La Sayette, V., Eustache, F., et Vandenberghe, R. (2013). Amyloid imaging in cognitively normal individuals, at-risk populations and preclinical Alzheimer's disease. NeuroImage Clin. 2, 356–365.

Choi, J.J., Selert, K., Vlachos, F., Wong, A., et Konofagou, E.E. (2011). Noninvasive and localized neuronal delivery using short ultrasonic pulses and microbubbles. Proc. Natl. Acad. Sci. 108, 16539–16544.

Chufan, E.E., Kapoor, K., Sim, H.-M., Singh, S., Talele, T.T., Durell, S.R., et Ambudkar, S.V. (2013). Multiple transport-active binding sites are available for a single substrate on human P-glycoprotein (ABCB1). PLoS ONE 8, e82463.

Cohen, A.D., Rabinovici, G.D., Mathis, C.A., Jagust, W.J., Klunk, W.E., et Ikonomovic, M.D. (2012). Using Pittsburgh compound B for in vivo PET imaging of fibrillar amyloid-beta. Adv. Pharmacol. 64, 27–81.

Colabufo, N.A., Berardi, F., Cantore, M., Contino, M., Inglese, C., Niso, M., et Perrone, R. (2010). Perspectives of P-glycoprotein modulating agents in oncology and neurodegenerative diseases: pharmaceutical, biological, and diagnostic potentials. J. Med. Chem. 53, 1883–1897.

Coley, H.M. (2010). Overcoming multidrug resistance in cancer: clinical studies of P-glycoprotein inhibitors. Methods Mol. Biol. 596, 341–358.

Colliot, O., Hamelin, L., et Sarazin, M. (2013). Magnetic resonance imaging for diagnosis of early Alzheimer's disease. Rev. Neurol. (Paris) 169, 724–728.

Cotruvo, J.A., Aron, A.T., Ramos-Torres, K.M., et Chang, C.J. (2015). Synthetic fluorescent probes for studying copper in biological systems. Chem. Soc. Rev. 44, 4400–4414.

Crich, S.G., Biancone, L., Cantaluppi, V., Duò, D., Esposito, G., Russo, S., Camussi, G., et Aime, S. (2004). Improved route for the visualization of stem cells labeled with a Gd-/Eu-chelate as dual (MRI and fluorescence) agent. Magn. Reson. Med. 51, 938–944.

Curtis, C., Gamez, J.E., Singh, U., Sadowsky, C.H., Villena, T., Sabbagh, M.N., Beach, T.G., Duara, R., Fleisher, A.S., Frey, K.A., *et al.* (2015). Phase 3 trial of flutemetamol labeled with radioactive fluorine 18 imaging and neuritic plaque density. JAMA Neurol. 72, 287–294.

Darghal, N., Garnier-Suillerot, A., Bouchemal, N., Gras, G., Geraldes, C.F.G.C., et Salerno, M. (2010). Accumulation of Eu3+ chelates in cells expressing or not P-glycoprotein: implications for blood-brain barrier crossing. J. Inorg. Biochem. 104, 47–54.

Dauchy, S., Dutheil, F., Weaver, R.J., Chassoux, F., Daumas-Duport, C., Couraud, P.-O., Scherrmann, J.-M., De Waziers, I., et Declèves, X. (2008). ABC transporters, cytochromes P450 and their main transcription factors: expression at the human blood-brain barrier. J. Neurochem. 107, 1518–1528.

Davis, T.P., Sanchez-Covarubias, L., et Tome, M.E. (2014). P-glycoprotein trafficking as a therapeutic target to optimize CNS drug delivery. Adv. Pharmacol. 71, 25–44.

Dawkins, E., et Small, D.H. (2014). Insights into the physiological function of the β-amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. J. Neurochem. 129, 756–769.

De Klerk, O.L., Bosker, F.J., Luurtsema, G., Nolte, I.M., Dierckx, R., Den Boer, J.A., et Potschka, H. (2011). The role of P-glycoprotein in psychiatric disorders: a reliable guard of the brain? Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem. 11, 197–209.

Dei, S., Coronnello, M., Floriddia, E., Bartolucci, G., Bellucci, C., Guandalini, L., Manetti, D., Romanelli, M.N., Salerno, M., Bello, I., *et al.* (2014). Multidrug resistance (MDR) reversers: High activity and efficacy in a series of asymmetrical N,N-bis(alkanol)amine aryl esters. Eur. J. Med. Chem. 87, 398–412.

DeKosky, S.T., et Scheff, S.W. (1990). Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. Ann. Neurol. 27, 457–464.

Develay, S., Tripier, R., Chuburu, F., Le Baccon, M., et Handel, H. (2003). A new versatile synthesis of macrotricyclic tetraazacycloalkane-based ligands from bis-aminal derivatives. Eur. J. Org. Chem. 2003, 3047–3050.

Dhenain, M., El Tannir El Tayara, N., Wu, T.-D., Guégan, M., Volk, A., Quintana, C., et Delatour, B. (2009). Characterization of in vivo MRI detectable thalamic amyloid plaques from APP/PS1 mice. Neurobiol. Aging 30, 41–53.

Dong, J., Revilla-Sanchez, R., Moss, S., et Haydon, P.G. (2010). Multiphoton in vivo imaging of amyloid in animal models of Alzheimer's disease. Neuropharmacology 59, 268–275.

Doody, R.S., Thomas, R.G., Farlow, M., Iwatsubo, T., Vellas, B., Joffe, S., Kieburtz, K., Raman, R., Sun, X., Aisen, P.S., *et al.* (2014). Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. N. Engl. J. Med. 370, 311–321.

Drachman, D.A. (2014). The amyloid hypothesis, time to move on: amyloid is the downstream result, not cause, of Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. 10, 372–380.

Drzezga, A., Grimmer, T., Riemenschneider, M., Lautenschlager, N., Siebner, H., Alexopoulus, P., Minoshima, S., Schwaiger, M., et Kurz, A. (2005). Prediction of individual clinical outcome in MCI by means of genetic assessment and (18)F-FDG PET. J. Nucl. Med. 46, 1625–1632.

Dubois, B., Hampel, H., Feldman, H.H., Scheltens, P., Aisen, P., Andrieu, S., Bakardjian, H., Benali, H., Bertram, L., Blennow, K., *et al.* (2016). Preclinical Alzheimer's disease: definition, natural history, and diagnostic criteria. Alzheimers Dement. 12, 292–323.

Eckford, P.D.W., et Sharom, F.J. (2009). ABC efflux pump-based resistance to chemotherapy drugs. Chem. Rev. 109, 2989–3011.

Eckroat, T.J., Mayhoub, A.S., et Garneau-Tsodikova, S. (2013). Amyloid-β probes: review of structure–activity and brain-kinetics relationships. Beilstein J. Org. Chem. 9, 1012–1044.

Erickson, M.A., et Banks, W.A. (2013). Blood–brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer's disease. J. Cereb. Blood Flow Metab. 33, 1500–1513.

Errante, Y., Cirimele, V., Mallio, C.A., Di Lazzaro, V., Zobel, B.B., et Quattrocchi, C.C. (2014). Progressive increase of T1 signal intensity of the dentate nucleus on unenhanced magnetic resonance images is associated with cumulative doses of intravenously administered gadodiamide in patients with normal renal function, suggesting dechelation. Invest. Radiol. 49, 685–690.

Ewers, M., Sperling, R.A., Klunk, W.E., Weiner, M.W., et Hampel, H. (2011). Neuroimaging markers for the prediction and early diagnosis of Alzheimer's disease dementia. Trends Neurosci. 34, 430–442.

Falangola, M.F., Lee, S.-P., Nixon, R.A., Duff, K., et Helpern, J.A. (2005). Histological co-localization of iron in Aβ plaques of PS/APP transgenic mice. Neurochem. Res. 30, 201–205.

Ferry, D.R., Malkhandi, P.J., Russell, M.A., et Kerr, D.J. (1995). Allosteric regulation of [3H]vinblastine binding to P-glycoprotein of MCF-7 ADR cells by dexniguldipine. Biochem. Pharmacol. 49, 1851–1861.

Filali, A., Yaouanc, J.-J., et Handel, H. (1991). Stoichiometric mono N-functionalization of tetraazamacrocycles via phosphoryl-protected intermediates. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 30, 560–561.

Filippi, M., et Grossman, R.I. (2002). MRI techniques to monitor MS evolution: the present and the future. Neurology 58, 1147–1153.

Fodero-Tavoletti, M.T., Cappai, R., McLean, C.A., Pike, K.E., Adlard, P.A., Cowie, T., Connor, A.R., Masters, C.L., Rowe, C.C., et Villemagne, V.L. (2009). Amyloid imaging in Alzheimer's disease and other dementias. Brain Imaging Behav. 3, 246–261.

Fox, E., et Bates, S.E. (2007). Tariquidar (XR9576): a P-glycoprotein drug efflux pump inhibitor. Expert Rev. Anticancer Ther. 7, 447–459.

Fox, E., Widemann, B.C., Pastakia, D., Chen, C.C., Yang, S.X., Cole, D., et Balis, F.M. (2015). Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of tariquidar (XR9576), a P-glycoprotein inhibitor, in combination with doxorubicin, vinorelbine, or docetaxel in children and adolescents with refractory solid tumors. Cancer Chemother. Pharmacol. 76, 1273–1283.

Frenzel, T., Lengsfeld, P., Schirmer, H., Hütter, J., et Weinmann, H.-J. (2008). Stability of gadolinium-based magnetic resonance imaging contrast agents in human serum at 37°C. Invest. Radiol. 43, 817–828.

Frezard, F., et Garnier-Suillerot, A. (1991). Comparison of the membrane transport of anthracycline derivatives in drug-resistant and drug-sensitive K562 cells. Eur. J. Biochem. 196, 483–491.

Frindel, M., Camus, N., Rauscher, A., Bourgeois, M., Alliot, C., Barré, L., Gestin, J.-F., Tripier, R., et Faivre-Chauvet, A. (2014). Radiolabeling of HTE1PA: a new monopicolinate cyclam derivative for Cu-64 phenotypic imaging. In vitro and in vivo stability studies in mice. Nucl. Med. Biol. 41 Suppl, e49-57.

Frisoni, G.B., Bocchetta, M., Chetelat, G., Rabinovici, G.D., de Leon, M.J., Kaye, J., Reiman, E.M., Scheltens, P., Barkhof, F., Black, S.E., *et al.* (2013). Imaging markers for Alzheimer disease. Neurology 81, 487–500.

Frullano, L., et Caravan, P. (2011). Strategies for the preparation of bifunctional gadolinium(III) chelators. Curr. Org. Synth. 8, 535–565.

Fu, D., et Arias, I.M. (2012). Intracellular trafficking of P-glycoprotein. Int. J. Biochem. Cell Biol. 44, 461–464.

Garcia-Alloza, M., et Bacskai, B.J. (2004). Techniques for brain imaging in vivo. Neuromolecular Med. 6, 65–78.

Garcia-Alloza, M., Borrelli, L.A., Rozkalne, A., Hyman, B.T., et Bacskai, B.J. (2007). Curcumin labels amyloid pathology in vivo, disrupts existing plaques, and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model. J. Neurochem. 102, 1095–1104.

García-Beltrán, O., Cassels, B.K., Pérez, C., Mena, N., Núñez, M.T., Martínez, N.P., Pavez, P., et Aliaga, M.E. (2014). Coumarin-based fluorescent probes for dual recognition of copper(II) and iron(III) ions and their application in bio-imaging. Sensors 14, 1358–1371.

Garwood, C., Faizullabhoy, A., Wharton, S.B., Ince, P.G., Heath, P.R., Shaw, P.J., Baxter, L., Gelsthorpe, C., Forster, G., Matthews, F.E., *et al.* (2013). Calcium dysregulation in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 39, 788–799.

Geldenhuys, W., Wehrung, D., Groshev, A., Hirani, A., et Sutariya, V. (2015). Brain-targeted delivery of doxorubicin using glutathione-coated nanoparticles for brain cancers. Pharm. Dev. Technol. 20, 497–506.

George, D.R., Qualls, S.H., Camp, C.J., et Whitehouse, P.J. (2013). Renovating Alzheimer's: "constructive" reflections on the new clinical and research diagnostic guidelines. Gerontologist 53, 378–387.

Giannakopoulos, P., Herrmann, F.R., Bussière, T., Bouras, C., Kövari, E., Perl, D.P., Morrison, J.H., Gold, G., et Hof, P.R. (2003). Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. Neurology 60, 1495–1500.

Gilbert, M., Snyder, C., Corcoran, C., Norton, M.C., Lyketsos, C.G., et Tschanz, J.T. (2014). The association of traumatic brain injury with rate of progression of cognitive and functional impairment in a population-based cohort of Alzheimer's disease: the Cache County Dementia Progression Study. Int. Psychogeriatr. 26, 1593–1601.

Gleeson, M.P. (2008). Generation of a set of simple, interpretable ADMET rules of thumb. J. Med. Chem. 51, 817–834.

Gosselet, F., Saint-Pol, J., Candela, P., et Fenart, L. (2013). Amyloid-β peptides, Alzheimer's disease and the blood-brain barrier. Curr. Alzheimer Res. 10, 1015–1033.

Gottesman, M.M., Fojo, T., et Bates, S.E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP–dependent transporters. Nat. Rev. Cancer 2, 48–58.

Grimm, M.O.W., Mett, J., Stahlmann, C.P., Haupenthal, V.J., Zimmer, V.C., et Hartmann, T. (2013). Neprilysin and Aβ clearance: impact of the APP intracellular domain in NEP regulation and implications in Alzheimer's disease. Front. Aging Neurosci. 5, 98.

Grobner, T. (2006). Gadolinium – a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis? Nephrol. Dial. Transplant. 21, 1104–1108.

Gupte, A., et Mumper, R.J. (2009). Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. Cancer Treat. Rev. 35, 32–46.

Hansson, O., Zetterberg, H., Buchhave, P., Andreasson, U., Londos, E., Minthon, L., et Blennow, K. (2007). Prediction of Alzheimer's disease using the CSF Aβ42/Aβ40 ratio in patients with mild cognitive impairment. Dement. Geriatr. Cogn. Disord. 23, 316–320.

Hao, D., Ai, T., Goerner, F., Hu, X., Runge, V.M., et Tweedle, M. (2012). MRI contrast agents: basic chemistry and safety. J. Magn. Reson. Imaging 36, 1060–1071.

Hao, G., Zhou, J., Guo, Y., Long, M.A., Anthony, T., Stanfield, J., Hsieh, J.-T., et Sun, X. (2011). A cell permeable peptide analog as a potential-specific PET imaging probe for prostate cancer detection. Amino Acids 41, 1093–1101.

Hardy, J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. Science 297, 353–356.

Hardy, J.A., et Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. Science 256, 184–185.

Haupt, C., Leppert, J., Rönicke, R., Meinhardt, J., Yadav, J.K., Ramachandran, R., Ohlenschläger, O., Reymann, K.G., Görlach, M., et Fändrich, M. (2012). Structural basis of β-amyloid-dependent synaptic dysfunctions. Angew. Chem. Int. Ed. 51, 1576–1579.

Hawkins, B.T., et Davis, T.P. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. Pharmacol. Rev. 57, 173–185.

Hayne, D.J., Lim, S., et Donnelly, P.S. (2014). Metal complexes designed to bind to amyloid-β for the diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. Chem. Soc. Rev. 43, 6701–6715.

Hebert, L.E., Weuve, J., Scherr, P.A., et Evans, D.A. (2013). Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. Neurology 80, 1778–1783.

Herrup, K. (2010). Reimagining Alzheimer's disease—an age-based hypothesis. J. Neurosci. 30, 16755–16762.

Hervé, G., Bernard, H., Le Bris, N., Yaouanc, J.-J., Handel, H., et Toupet, L. (1998). A new route to cyclen, cyclam and homocyclen. Tetrahedron Lett. 39, 6861–6864.

Hickey, J.L., et Donnelly, P.S. (2012). Diagnostic imaging of Alzheimer's disease with copper and technetium complexes. Coord. Chem. Rev. 256, 2367–2380.

Hickey, J.L., Lim, S., Hayne, D.J., Paterson, B.M., White, J.M., Villemagne, V.L., Roselt, P., Binns, D., Cullinane, C., Jeffery, C.M., *et al.* (2013). Diagnostic imaging agents for Alzheimer's disease: copper radiopharmaceuticals that target Aβ plaques. J. Am. Chem. Soc. 135, 16120–16132.

Higuchi, M., Iwata, N., Matsuba, Y., Sato, K., Sasamoto, K., et Saido, T.C. (2005). 19F and 1H MRI detection of amyloid beta plaques in vivo. Nat. Neurosci. 8, 527–533.

Hohman, T.J., Bell, S.P., Jefferson, A.L., et Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2015). The role of vascular endothelial growth factor in neurodegeneration and cognitive decline: exploring interactions with biomarkers of Alzheimer disease. JAMA Neurol. 72, 520–529.

Hoosain, F.G., Choonara, Y.E., Tomar, L.K., Kumar, P., Tyagi, C., du Toit, L.C., et Pillay, V. (2015). Bypassing P-glycoprotein drug efflux mechanisms: possible applications in pharmacoresistant schizophrenia therapy. BioMed Res. Int. 2015, 484963.

Huddleston, D.E., et Small, S.A. (2005). Technology insight: imaging amyloid plaques in the living brain with positron emission tomography and MRI. Nat. Clin. Pract. Neurol. 1, 96–105.

Hurtado, D.E., Molina-Porcel, L., Iba, M., Aboagye, A.K., Paul, S.M., Trojanowski, J.Q., et Lee, V.M.-Y. (2010). Aβ accelerates the spatiotemporal progression of tau pathology and augments tau amyloidosis in an Alzheimer mouse model. Am. J. Pathol. 177, 1977–1988.

Hvattum, E., Normann, P.T., Jamieson, G.C., Lai, J.J., et Skotland, T. (1995). Detection and quantitation of gadolinium chelates in human serum and urine by high-performance liquid chromatography and post-column derivatization of gadolinium with Arsenazo III. J. Pharm. Biomed. Anal. 13, 927–932.

Idée, J.-M., Port, M., Robic, C., Medina, C., Sabatou, M., et Corot, C. (2009). Role of thermodynamic and kinetic parameters in gadolinium chelate stability. J. Magn. Reson. Imaging 30, 1249–1258.

Irizarry, M.C. (2004). Biomarkers of Alzheimer disease in plasma. NeuroRx 1, 226–234.

Ishiwata, K., Kawamura, K., Yanai, K., et Hendrikse, N.H. (2007). In vivo evaluation of P-glycoprotein modulation of 8 PET radioligands used clinically. J. Nucl. Med. 48, 81–87.

Itagaki, S., McGeer, P.L., Akiyama, H., Zhu, S., et Selkoe, D. (1989). Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. J. Neuroimmunol. 24, 173–182.

Jack, C.R. Jr., Garwood, M., Wengenack, T.M., Borowski, B., Curran, G.L., Lin, J., Adriany, G., Gröhn, O.H.J., Grimm, R., et Poduslo, J.F. (2004). In vivo visualization of Alzheimer's amyloid plaques by magnetic resonance imaging in transgenic mice without a contrast agent. Magn. Reson. Med. 52, 1263–1271.

Jack, C.R. Jr., Knopman, D.S., Jagust, W.J., Shaw, L.M., Aisen, P.S., Weiner, M.W., Petersen, R.C., et Trojanowski, J.Q. (2010). Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. Lancet Neurol. 9, 119–128.

Jack, C.R. Jr., Albert, M., Knopman, D.S., McKhann, G.M., Sperling, R.A., Carillo, M., Thies, W., et Phelps, C.H. (2011). Introduction to revised criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: National Institute on Aging and the Alzheimer Association workgroups. Alzheimers Dement. 7, 257–262.

Jack, C.R. Jr., Knopman, D.S., Jagust, W.J., Petersen, R.C., Weiner, M.W., Aisen, P.S., Shaw, L.M., Vemuri, P., Wiste, H.J., Weigand, S.D., *et al.* (2013). Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. Lancet Neurol. 12, 207–216.

Jack, C.R. Jr., Bennett, D.A., Blennow, K., Carrillo, M.C., Feldman, H.H., Frisoni, G.B., Hampel, H., Jagust, W.J., Johnson, K.A., Knopman, D.S., *et al*. (2016). A/T/N: an unbiased descriptive classification scheme for Alzheimer disease biomarkers. Neurology 87, 539–547.

Jin, M.S., Oldham, M.L., Zhang, Q., et Chen, J. (2012). Crystal structure of the multidrug transporter P-glycoprotein from Caenorhabditis elegans. Nature 490, 566–569.

Johnson, K.A., Schultz, A., Betensky, R.A., Becker, J.A., Sepulcre, J., Rentz, D., Mormino, E., Chhatwal, J., Amariglio, R., Papp, K., *et al.* (2016). Tau positron emission tomographic imaging in aging and early Alzheimer disease. Ann. Neurol. 79, 110–119.

Juliano, R.L., et Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. Biochim. Biophys. Acta 455, 152–162.

Jung, H.S., Kwon, P.S., Lee, J.W., Kim, J.I., Hong, C.S., Kim, J.W., Yan, S., Lee, J.Y., Lee, J.H., Joo, T., *et al*. (2009). Coumarin-derived Cu(2+)-selective fluorescence sensor: synthesis, mechanisms, and applications in living cells. J. Am. Chem. Soc. 131, 2008–2012.

Kadioglu, O., Saeed, M.E.M., Valoti, M., Frosini, M., Sgaragli, G., et Efferth, T. (2016). Interactions of human P-glycoprotein transport substrates and inhibitors at the drug binding domain: functional and molecular docking analyses. Biochem. Pharmacol. 104, 42–51.

Kamer, P.C., van Leeuwen, P.W., et Reek, J.N. (2001). Wide bite angle diphosphines: xantphos ligands in transition metal complexes and catalysis. Acc. Chem. Res. 34, 895–904.

Kaminsky, Y.G., Tikhonova, L.A., et Kosenko, E.A. (2015). Critical analysis of Alzheimer's amyloid-beta toxicity to mitochondria. Front. Biosci. Landmark Ed. 20, 173–197.

Kanda, T., Osawa, M., Oba, H., Toyoda, K., Kotoku, J. 'ichi, Haruyama, T., Takeshita, K., et Furui, S. (2015). High signal intensity in dentate nucleus on unenhanced T1-weighted MR images: association with linear versus macrocyclic gadolinium chelate administration. Radiology 275, 803–809.

Kanda, T., Oba, H., Toyoda, K., Kitajima, K., et Furui, S. (2016). Brain gadolinium deposition after administration of gadolinium-based contrast agents. Jpn. J. Radiol. 34, 3–9.

Kandimalla, K.K., Wengenack, T.M., Curran, G.L., Gilles, E.J., et Poduslo, J.F. (2007). Pharmacokinetics and amyloid plaque targeting ability of a novel peptide-based magnetic resonance contrast agent in wild-type and Alzheimer's disease transgenic mice. J. Pharmacol. Exp. Ther. 322, 541–549.

Karow, D.S., McEvoy, L.K., Fennema-Notestine, C., Hagler, D.J., Jennings, R.G., Brewer, J.B., Hoh, C.K., et Dale, A.M. (2010). Relative capability of MR imaging and FDG PET to depict changes associated with prodromal and early Alzheimer disease. Radiology 256, 932–942.

Kawakami, R., Sawada, K., Sato, A., Hibi, T., Kozawa, Y., Sato, S., Yokoyama, H., et Nemoto, T. (2013). Visualizing hippocampal neurons with in vivo two-photon microscopy using a 1030 nm picosecond pulse laser. Sci. Rep. 3, 1014.

Kelder, J., Grootenhuis, P.D., Bayada, D.M., Delbressine, L.P., et Ploemen, J.P. (1999). Polar molecular surface as a dominating determinant for oral absorption and brain penetration of drugs. Pharm. Res. 16, 1514–1519.

Kim, T.-E., Lee, H., Lim, K.S., Lee, S., Yoon, S.-H., Park, K.-M., Han, H., Shin, S.-G., Jang, I.-J., Yu, K.-S., *et al.* (2014). Effects of HM30181, a P-glycoprotein inhibitor, on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of loperamide in healthy volunteers. Br. J. Clin. Pharmacol. 78, 556–564.

Klunk, W.E. (2011). Amyloid imaging as a biomarker for cerebral β-amyloidosis and risk prediction for Alzheimer dementia. Neurobiol. Aging 32, Supplement 1, S20–S36.

Klunk, W.E., et Mathis, C.A. (2008). The future of amyloid-beta imaging: a tale of radionuclides and tracer proliferation. Curr. Opin. Neurol. 21, 683–687.

Klunk, W.E., Jacob, R.F., et Mason, R.P. (1999). Quantifying amyloid beta-peptide (Abeta) aggregation using the Congo red-Abeta (CR-abeta) spectrophotometric assay. Anal. Biochem. 266, 66–76.

Klunk, W.E., Engler, H., Nordberg, A., Wang, Y., Blomqvist, G., Holt, D.P., Bergström, M., Savitcheva, I., Huang, G.-F., Estrada, S., *et al.* (2004). Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh compound-B. Ann. Neurol. 55, 306–319.

Kotek, J., Hermann, P., Vojtíšek, P., Rohovec, J., et Lukeš, I. (2000). Crystal structures and reactivity of 3a,5a,8a,10a-tetraazaperhydropyrene derivatives. An alternative approach to selective nitrogen alkylation of 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane (cyclam). Collect. Czechoslov. Chem. Commun. 65, 243–266.

Kotek, J., Lubal, P., Hermann, P., Císařová, I., Lukeš, I., Godula, T., Svobodová, I., Táborský, P., et Havel, J. (2003). High thermodynamic stability and extraordinary kinetic inertness of copper(II) complexes with 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-1,8-bis(methylphosphonic acid): example of a rare isomerism between kinetically inert penta- and hexacoordinated copper(II) complexes. Chem. – Eur. J. 9, 233–248.

Kotler, S.A., Walsh, P., Brender, J.R., et Ramamoorthy, A. (2014). Differences between amyloid-β aggregation in solution and on the membrane: insights into elucidation of the mechanistic details of Alzheimer's disease. Chem. Soc. Rev. 43, 6692–6700.

LaFerla, F.M., et Oddo, S. (2005). Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. Trends Mol. Med. 11, 170–176.

Lambert, C., Beraldo, H., Lievre, N., Garnier-Suillerot, A., Dorlet, P., et Salerno, M. (2013). Bis(thiosemicarbazone) copper complexes: mechanism of intracellular accumulation. J. Biol. Inorg. Chem. 18, 59–69.

Lambert, M.P., Velasco, P.T., Chang, L., Viola, K.L., Fernandez, S., Lacor, P.N., Khuon, D., Gong, Y., Bigio, E.H., Shaw, P., *et al.* (2007). Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of Abeta. J. Neurochem. 100, 23–35.

Le Baccon, M., Chuburu, F., Toupet, L., Handel, H., Soibinet, M., Déchamps-Olivier, I., Barbier, J.-P., et Aplincourt, M. (2001). Bis-aminals: efficient tools for bis-macrocycle synthesis. New J. Chem. 25, 1168–1174.

Lee, G., Babakhanian, K., Ramaswamy, M., Prat, A., Wosik, K., et Bendayan, R. (2007). Expression of the ATP-binding cassette membrane transporter, ABCG2, in human and rodent brain microvessel endothelial and glial cell culture systems. Pharm. Res. 24, 1262–1274.

Leeson, P. (2012). Drug discovery: chemical beauty contest. Nature 481, 455–456.

Lesné, S., Koh, M.T., Kotilinek, L., Kayed, R., Glabe, C.G., Yang, A., Gallagher, M., et Ashe, K.H. (2006). A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. Nature 440, 352–357.

Lesné, S.E., Sherman, M.A., Grant, M., Kuskowski, M., Schneider, J.A., Bennett, D.A., et Ashe, K.H. (2013). Brain amyloid-β oligomers in ageing and Alzheimer's disease. Brain 136, 1383–1398.

Letrent, S.P., Pollack, G.M., Brouwer, K.R., et Brouwer, K.L.R. (1999). Effects of a potent and specific P-glycoprotein inhibitor on the blood-brain barrier distribution and antinociceptive effect of morphine in the rat. Drug Metab. Dispos. 27, 827–834.

LeVine, H., 3rd (1993). Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. Protein Sci. 2, 404–410.

Lewis, J.S., Laforest, R., Dehdashti, F., Grigsby, P.W., Welch, M.J., et Siegel, B.A. (2008). An imaging comparison of 64Cu-ATSM and 60Cu-ATSM in cancer of the uterine cervix. J. Nucl. Med. 49, 1177–1182.

Liang, X., et Sadler, P.J. (2004). Cyclam complexes and their applications in medicine. Chem. Soc. Rev. 33, 246–266.

Lima, L.M.P., Delgado, R., Marques, F., Gano, L., et Santos, I. (2010). TETA analogue containing one methylenephosphonate pendant arm: lanthanide complexes and biological evaluation of its 153Sm and 166Ho complexes. Eur. J. Med. Chem. 45, 5621–5627.

Lima, L.M.P., Esteban-Gómez, D., Delgado, R., Platas-Iglesias, C., et Tripier, R. (2012). Monopicolinate cyclen and cyclam derivatives for stable copper(II) complexation. Inorg. Chem. 51, 6916–6927.

Lima, L.M.P., Beyler, M., Delgado, R., Platas-Iglesias, C., et Tripier, R. (2015). Investigating the complexation of the Pb2+/Bi3+ pair with dipicolinate cyclen ligands. Inorg. Chem. 54, 7045–7057.

Lin, M.M., Kim, D.K., El Haj, A.J., et Dobson, J. (2008). Development of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONS) for translation to clinical applications. IEEE Trans. Nanobioscience 7, 298–305.

Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., et Feeney, P.J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Adv. Drug Deliv. Rev. 46, 3–26.

Lo, R.Y., Hubbard, A.E., Shaw, L.M., Trojanowski, J.Q., Petersen, R.C., Aisen, P.S., Weiner, M.W., Jagust, W.J., et Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2011). Longitudinal change of biomarkers in cognitive decline. Arch. Neurol. 68, 1257–1266.

Loo, T.W., et Clarke, D.M. (2015). Mapping the binding site of the inhibitor tariquidar that stabilizes the first transmembrane domain of P-glycoprotein. J. Biol. Chem. 290, 29389–29401.

Lopategui Cabezas, I., Herrera Batista, A., et Pentón Rol, G. (2014). The role of glial cells in Alzheimer disease: potential therapeutic implications. Neurología 29, 305–309.

Lopez, O.L., McDade, E., Riverol, M., et Becker, J.T. (2011). Evolution of the diagnostic criteria for degenerative and cognitive disorders. Curr. Opin. Neurol. 24, 532–541.

López-González, I., Schlüter, A., Aso, E., Garcia-Esparcia, P., Ansoleaga, B., LLorens, F., Carmona, M., Moreno, J., Fuso, A., Portero-Otin, M., *et al.* (2015). Neuroinflammatory signals in Alzheimer disease and APP/PS1 transgenic mice: correlations with plaques, tangles, and oligomeric species. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 74, 319–344.

Löscher, W., et Potschka, H. (2005a). Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. NeuroRX 2, 86–98.

Löscher, W., et Potschka, H. (2005b). Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. Nat. Rev. Neurosci. 6, 591–602.

Louie, J., et Hartwig, J.F. (1995). Palladium-catalyzed synthesis of arylamines from aryl halides. Mechanistic studies lead to coupling in the absence of tin reagents. Tetrahedron Lett. 36, 3609–3612.

Lozzio, C.B., et Lozzio, B.B. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. Blood 45, 321–334.

Ma, J., et Biggin, P.C. (2013). Substrate versus inhibitor dynamics of P-glycoprotein. Proteins 81, 1653–1668.

Magde, D., Rojas, G.E., et Seybold, P.G. (1999). Solvent dependence of the fluorescence lifetimes of xanthene dyes. Photochem. Photobiol. 70, 737–744.

Marbeuf-Gueye, C., Salerno, M., Quidu, P., et Garnier-Suillerot, A. (2000). Inhibition of the P-glycoprotein- and multidrug resistance protein-mediated efflux of anthracyclines and calceinacetoxymethyl ester by PAK-104P. Eur. J. Pharmacol. 391, 207–216.

Marquez, B., et Van Bambeke, F. (2011). ABC multidrug transporters: target for modulation of drug pharmacokinetics and drug-drug interactions. Curr. Drug Targets 12, 600–620.

Martelli, C., Dei, S., Lambert, C., Manetti, D., Orlandi, F., Romanelli, M.N., Scapecchi, S., Salerno, M., et Teodori, E. (2011). Inhibition of P-glycoprotein-mediated Multidrug Resistance (MDR) by N,N-bis(cyclohexanol)amine aryl esters: further restriction of molecular flexibility maintains high potency and efficacy. Bioorg. Med. Chem. Lett. 21, 106–109.

Martiniano, S.L., Hoppe, J.E., Sagel, S.D., et Zemanick, E.T. (2014). Advances in the diagnosis and treatment of cystic fibrosis. Adv. Pediatr. 61, 225–243.

Martins, A.F., Morfin, J.-F., Kubíčková, A., Kubíček, V., Buron, F., Suzenet, F., Salerno, M., Lazar, A.N., Duyckaerts, C., Arlicot, N., *et al.* (2013). PiB-conjugated, metal-based imaging probes: multimodal approaches for the visualization of β-amyloid plaques. ACS Med. Chem. Lett. 4, 436–440.

Martins, A.F., Morfin, J.-F., Geraldes, C.F.G.C., et Tóth, É. (2014). Gd3+ complexes conjugated to Pittsburgh compound B: potential MRI markers of β-amyloid plaques. J. Biol. Inorg. Chem. 19, 281–295.

Martins, A.F., Dias, D.M., Morfin, J.-F., Lacerda, S., Laurents, D.V., Tóth, É., et Geraldes, C.F.G.C. (2015). Interaction of PiB-derivative metal complexes with beta-amyloid peptides: selective recognition of the aggregated forms. Chem. – Eur. J. 21, 5413–5422.

Martins, A.F., Oliveira, A.C., Morfin, J.-F., Laurents, D.V., Tóth, É., et Geraldes, C.F.G.C. (2016). Associating a negatively charged GdDOTA-derivative to the

Pittsburgh compound B for targeting Aβ amyloid aggregates. J. Biol. Inorg. Chem. JBIC Publ. Soc. Biol. Inorg. Chem. 21, 83–99.

Marzolini, C., Paus, E., Buclin, T., et Kim, R.B. (2004). Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. Clin. Pharmacol. Ther. 75, 13–33.

Masters, C.L., et Selkoe, D.J. (2012). Biochemistry of amyloid β-protein and amyloid deposits in Alzheimer disease. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2, a006262.

Mathis, C.A., Mason, N.S., Lopresti, B.J., et Klunk, W.E. (2012). Development of positron emission tomography β-amyloid plaque imaging agents. Semin. Nucl. Med. 42, 423–432.

Matsuzaki, K. (2014). How do membranes initiate Alzheimer's disease? Formation of toxic amyloid fibrils by the amyloid β-protein on ganglioside clusters. Acc. Chem. Res. 47, 2397–2404.

McEneny-King, A., Edginton, A.N., et Rao, P.P.N. (2015). Investigating the binding interactions of the anti-Alzheimer's drug donepezil with CYP3A4 and P-glycoprotein. Bioorg. Med. Chem. Lett. 25, 297–301.

McGeer, P.L., et McGeer, E.G. (2013). The amyloid cascade-inflammatory hypothesis of Alzheimer disease: implications for therapy. Acta Neuropathol. (Berl.) 126, 479–497.

McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., et Stadlan, E.M. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. Neurology 34, 939–939.

McKhann, G.M., Knopman, D.S., Chertkow, H., Hyman, B.T., Jack., C.R., Kawas, C.H., Klunk, W.E., Koroshetz, W.J., Manly, J.J., Mayeux, R., *et al.* (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National

Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. 7, 263–269.

Meier, S.M., Hanif, M., Adhireksan, Z., Pichler, V., Novak, M., Jirkovsky, E., Jakupec, M.A., Arion, V.B., Davey, C.A., Keppler, B.K., *et al.* (2013). Novel metal(II) arene 2-pyridinecarbothioamides: a rationale to orally active organometallic anticancer agents. Chem. Sci. 4, 1837–1846.

Miller, D.S. (2015). Regulation of ABC transporters blood–brain barrier: the good, the bad, and the ugly. Dans Advances in Cancer Research, T. Ishikawa, et J.D. Schuetz, éds. (Academic Press), pp. 43–70.

Miller, Y., Ma, B., et Nussinov, R. (2012). Metal binding sites in amyloid oligomers: complexes and mechanisms. Coord. Chem. Rev. 256, 2245–2252.

Montagne, A., Nation, D.A., Pa, J., Sweeney, M.D., Toga, A.W., et Zlokovic, B.V. (2016). Brain imaging of neurovascular dysfunction in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol. (Berl.) 131, 687–707.

Morcos, S.K. (2008). Extracellular gadolinium contrast agents: differences in stability. Eur. J. Radiol. 66, 175–179.

Musiek, E.S., et Holtzman, D.M. (2015). Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and "wingmen." Nat. Neurosci. 18, 800–806.

Nakada, T., Matsuzawa, H., Igarashi, H., Fujii, Y., et Kwee, I.L. (2008). In vivo visualization of senile-plaque-like pathology in Alzheimer's disease patients by MR microscopy on a 7T system. J. Neuroimaging 18, 125–129.

Necula, M., Kayed, R., Milton, S., et Glabe, C.G. (2007). Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid beta oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct. J. Biol. Chem. 282, 10311–10324.

Nelson, P.T., Alafuzoff, I., Bigio, E.H., Bouras, C., Braak, H., Cairns, N.J., Castellani, R.J., Crain, B.J., Davies, P., Del Tredici, K., *et al.* (2012). Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 71, 362–381.

Niccoli Asabella, A., Cascini, G.L., Altini, C., Paparella, D., Notaristefano, A., et Rubini, G. (2014). The copper radioisotopes: a systematic review with special interest to 64Cu. BioMed Res. Int. 2014, e786463.

Noetzli, M., Guidi, M., Ebbing, K., Eyer, S., Zumbach, S., Giannakopoulos, P., von Gunten, A., Csajka, C., et Eap, C.B. (2013). Relationship of CYP2D6, CYP3A, POR, and ABCB1 genotypes with galantamine plasma concentrations. Ther. Drug Monit. 35, 270–275.

O'Brien, F.E. (2013). P-glycoprotein inhibition as a strategy to increase drug delivery across the blood-brain barrier: focus on antidepressants. University College Cork.

Obrig, H. (2014). NIRS in clinical neurology - a "promising" tool? NeuroImage 85 Pt 1, 535–546.

Ohnuma, S., Chufan, E., Nandigama, K., Jenkins, L.M.M., Durell, S.R., Appella, E., Sauna, Z.E., et Ambudkar, S.V. (2011). Inhibition of multidrug resistance-linked P-glycoprotein (ABCB1) function by 5'-fluorosulfonylbenzoyl 5'-adenosine: evidence for an ATP analogue that interacts with both drug-substrate-and nucleotide-binding sites. Biochemistry (Mosc.) 50, 3724–3735.

Okamura, N., Furumoto, S., Fodero-Tavoletti, M.T., Mulligan, R.S., Harada, R., Yates, P., Pejoska, S., Kudo, Y., Masters, C.L., Yanai, K., *et al.* (2014). Non-invasive assessment of Alzheimer's disease neurofibrillary pathology using 18F-THK5105 PET. Brain 137, 1762–1771.

Ono, M., Kung, M.-P., Hou, C., et Kung, H.F. (2002). Benzofuran derivatives as Aβ-aggregate-specific imaging agents for Alzheimer's disease. Nucl. Med. Biol. 29, 633–642.

Ono, M., Kawashima, H., Nonaka, A., Kawai, T., Haratake, M., Mori, H., Kung, M.-P., Kung, H.F., Saji, H., et Nakayama, M. (2006). Novel benzofuran derivatives for PET imaging of β-amyloid plaques in Alzheimer's disease brains. J. Med. Chem. 49, 2725–2730.

Ono, M., Ikeoka, R., Watanabe, H., Kimura, H., Fuchigami, T., Haratake, M., Saji, H., et Nakayama, M. (2010a). Synthesis and evaluation of novel chalcone derivatives with 99mTc/Re complexes as potential probes for detection of β-amyloid plaques. ACS Chem. Neurosci. 1, 598–607.

Ono, M., Fuchi, Y., Fuchigami, T., Kobashi, N., Kimura, H., Haratake, M., Saji, H., et Nakayama, M. (2010b). Novel benzofurans with 99mTc complexes as probes for imaging cerebral β-amyloid plaques. ACS Med. Chem. Lett. 1, 443–447.

Ono, M., et Saji, H. (2011). SPECT imaging agents for detecting cerebral β-amyloid plaques. Int. J. Mol. Imaging 2011, 1–12.

Ono, M., Cheng, Y., Kimura, H., Watanabe, H., Matsumura, K., Yoshimura, M., Iikuni, S., Okamoto, Y., Ihara, M., Takahashi, R., *et al.* (2013). Development of novel 123I-labeled pyridyl benzofuran derivatives for SPECT imaging of β-amyloid plaques in Alzheimer's disease. PLoS ONE 8, e74104.

Orlandi, F., Coronnello, M., Bellucci, C., Dei, S., Guandalini, L., Manetti, D., Martelli, C., Romanelli, M.N., Scapecchi, S., Salerno, M., *et al.* (2013). New structure-activity relationship studies in a series of N,N-bis(cyclohexanol)amine aryl esters as potent reversers of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance (MDR). Bioorg. Med. Chem. 21, 456–465.

Oukoloff, K., Cieslikiewicz-Bouet, M., Chao, S., Da Costa Branquinho, E., Bouteiller, C., Jean, L., et Renard, P.-Y. (2015). PET and SPECT radiotracers for Alzheimer's disease. Curr. Med. Chem. 22, 3278–3304.

Ouyang, H., Andersen, T.E., Chen, W., Nofsinger, R., Steffansen, B., et Borchardt, R.T. (2009). A comparison of the effects of P-glycoprotein inhibitors on the blood-

brain barrier permeation of cyclic prodrugs of an opioid peptide (DADLE). J. Pharm. Sci. 98, 2227–2236.

Palmqvist, S., Zetterberg, H., Mattsson, N., Johansson, P., Minthon, L., Blennow, K., Olsson, M., et Hansson, O. (2015). Detailed comparison of amyloid PET and CSF biomarkers for identifying early Alzheimer disease. Neurology 85, 1240–1249.

Pappenheimer, A.M. (1917). Experimental studies upon lymphocytes: the reactions of lymphocytes under various experimental conditions. J. Exp. Med. 25, 633–650.

Pardridge, W.M. (2007). Blood-brain barrier delivery. Drug Discov. Today 12, 54–61.

Parveen, Z., Stockner, T., Bentele, C., Pferschy, S., Kraupp, M., Freissmuth, M., Ecker, G.F., et Chiba, P. (2011). Molecular dissection of dual pseudosymmetric solute translocation pathways in human P-glycoprotein. Mol. Pharmacol. 79, 443–452.

Paterson, B.M., et Donnelly, P.S. (2011). Copper complexes of bis(thiosemicarbazones): from chemotherapeutics to diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals. Chem. Soc. Rev. 40, 3005–3018.

Patil, R., Gangalum, P.R., Wagner, S., Portilla-Arias, J., Ding, H., Rekechenetskiy, A., Konda, B., Inoue, S., Black, K.L., Ljubimova, J.Y., *et al.* (2015). Curcumin targeted, polymalic acid-based MRI contrast agent for the detection of aβ plaques in Alzheimer's disease. Macromol. Biosci. 15, 1212–1217.

Perl, D.P. (2010). Neuropathology of Alzheimer's disease. Mt. Sinai J. Med. 77, 32–42.

Perry, S.W., Norman, J.P., Barbieri, J., Brown, E.B., et Gelbard, H.A. (2011). Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. BioTechniques 50, 98–115.

Petiet, A., Santin, M., Bertrand, A., Wiggins, C.J., Petit, F., Houitte, D., Hantraye, P., Benavides, J., Debeir, T., Rooney, T., *et al.* (2012). Gadolinium-staining reveals

amyloid plaques in the brain of Alzheimer's transgenic mice. Neurobiol. Aging 33, 1533–1544.

Petrella, J.R., Sheldon, F.C., Prince, S.E., Calhoun, V.D., et Doraiswamy, P.M. (2011). Default mode network connectivity in stable vs progressive mild cognitive impairment. Neurology 76, 511–517.

Pfeifer, A., Knigge, U., Mortensen, J., Oturai, P., Berthelsen, A.K., Loft, A., Binderup, T., Rasmussen, P., Elema, D., Klausen, T.L., *et al.* (2012). Clinical PET of neuroendocrine tumors using 64Cu-DOTATATE: first-in-humans study. J. Nucl. Med. 53, 1207–1215.

Picot, A., Feuvrie, C., Barsu, C., Malvolti, F., Le Guennic, B., Le Bozec, H., Andraud, C., Toupet, L., et Maury, O. (2008). Synthesis, structures, optical properties, and TD-DFT studies of donor-p-conjugated dipicolinic acid/ester/amide ligands. Tetrahedron 64, 399–411.

Pierre, V.C., Allen, M.J., et Caravan, P. (2014). Contrast agents for MRI: 30+ years and where are we going? J. Biol. Inorg. Chem. 19, 127–131.

Pillai, Z.S., Ceroni, P., Kubeil, M., Heldt, J.-M., Stephan, H., et Bergamini, G. (2013). Dendrimers as Nd3+ ligands: effect of generation on the efficiency of the sensitized lanthanide emission. Chem. Asian J. 8, 771–777.

Pimplikar, S.W. (2009). Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. Int. J. Biochem. Cell Biol. 41, 1261–1268.

Poduslo, J.F., et Curran, G.L. (1996). Polyamine modification increases the permeability of proteins at the blood-nerve and blood-brain barriers. J. Neurochem. 66, 1599–1609.

Poduslo, J.F., Curran, G.L., Sanyal, B., et Selkoe, D.J. (1999). Receptor-mediated transport of human amyloid beta-protein 1-40 and 1-42 at the blood-brain barrier. Neurobiol. Dis. 6, 190–199.

Poduslo, J.F., Wengenack, T.M., Curran, G.L., Wisniewski, T., Sigurdsson, E.M., Macura, S.I., Borowski, B.J., et Jack., C.R. (2002). Molecular targeting of Alzheimer's amyloid plaques for contrast-enhanced magnetic resonance imaging. Neurobiol. Dis. 11, 315–329.

Poduslo, J.F., Curran, G.L., Peterson, J.A., McCormick, D.J., Fauq, A.H., Khan, M.A., et Wengenack, T.M. (2004). Design and chemical synthesis of a magnetic resonance contrast agent with enhanced in vitro binding, high blood–brain barrier permeability, and in vivo targeting to Alzheimer's disease amyloid plaques. Biochemistry 43, 6064–6075.

Poduslo, J.F., Ramakrishnan, M., Holasek, S.S., Ramirez-Alvarado, M., Kandimalla, K.K., Gilles, E.J., Curran, G.L., et Wengenack, T.M. (2007). In vivo targeting of antibody fragments to the nervous system for Alzheimer's disease immunotherapy and molecular imaging of amyloid plaques. J. Neurochem. 102, 420–433.

Poongavanam, V., Haider, N., et Ecker, G.F. (2012). Fingerprint-based in silico models for the prediction of P-glycoprotein substrates and inhibitors. Bioorg. Med. Chem. 20, 5388–5395.

Popa-Wagner, A., Buga, A.-M., Popescu, B., et Muresanu, D. (2013). Vascular cognitive impairment, dementia, aging and energy demand. A vicious cycle. J. Neural Transm. 122, 47–54.

Port, M., Idée, J.-M., Medina, C., Robic, C., Sabatou, M., et Corot, C. (2008). Efficiency, thermodynamic and kinetic stability of marketed gadolinium chelates and their possible clinical consequences: a critical review. Biometals 21, 469–490.

Price, J.C. (2012). Molecular brain imaging in the multimodality era. J. Cereb. Blood Flow Metab. 32, 1377–1392.

Prodi, L., Rampazzo, E., Rastrelli, F., Speghini, A., et Zaccheroni, N. (2015). Imaging agents based on lanthanide doped nanoparticles. Chem. Soc. Rev. 44, 4922–4952.

Pusztai, L., Wagner, P., Ibrahim, N., Rivera, E., Theriault, R., Booser, D., Symmans, F.W., Wong, F., Blumenschein, G., Fleming, D.R., *et al.* (2005). Phase II study of tariquidar, a selective P-glycoprotein inhibitor, in patients with chemotherapy-resistant, advanced breast carcinoma. Cancer 104, 682–691.

Radbruch, A., Weberling, L.D., Kieslich, P.J., Eidel, O., Burth, S., Kickingereder, P., Heiland, S., Wick, W., Schlemmer, H.-P., et Bendszus, M. (2015). Gadolinium retention in the dentate nucleus and globus pallidus is dependent on the class of contrast agent. Radiology 275, 783–791.

Ramakrishnan, M., Wengenack, T.M., Kandimalla, K.K., Curran, G.L., Gilles, E.J., Ramirez-Alvarado, M., Lin, J., Garwood, M., Jack, C.R., et Poduslo, J.F. (2008). Selective contrast enhancement of individual Alzheimer's disease amyloid plaques using a polyamine and Gd-DOTA conjugated antibody fragment against fibrillar Aβ42 for magnetic resonance molecular imaging. Pharm. Res. 25, 1861–1872.

Ramón y Cajal, S. (1910). Histologie du système nerveux de l'homme & des vertébrés (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid).

Rapisarda, V.A., Volentini, S.I., Farías, R.N., et Massa, E.M. (2002). Quenching of bathocuproine disulfonate fluorescence by Cu(I) as a basis for copper quantification. Anal. Biochem. 307, 105–109.

Rauk, A. (2009). The chemistry of Alzheimer's disease. Chem. Soc. Rev. 38, 2698–2715.

Regueiro-Figueroa, M., Bensenane, B., Ruscsák, E., Esteban-Gómez, D., Charbonnière, L.J., Tircsó, G., Tóth, I., Blas, A. de, Rodríguez-Blas, T., et Platas-Iglesias, C. (2011). Lanthanide dota-like complexes containing a picolinate pendant: structural entry for the design of Ln(III)-based luminescent probes. Inorg. Chem. 50, 4125–4141.

Reimer, P., et Vosshenrich, R. (2010). Detection and characterization of liver lesions using gadoxetic acid as a tissue-specific contrast agent. Biol. Targets Ther. 4, 199–212.

Reungpatthanaphong, P., Marbeuf-Gueye, C., Moyec, L.L., Salerno, M., et Garnier-Suillerot, A. (2004). Decrease of P-glycoprotein activity in K562/ADR cells by MbetaCD and filipin and lack of effect induced by cholesterol oxidase indicate that this transporter is not located in rafts. J. Bioenerg. Biomembr. 36, 533–543.

Ridha, B.H., Barnes, J., Bartlett, J.W., Godbolt, A., Pepple, T., Rossor, M.N., et Fox, N.C. (2006). Tracking atrophy progression in familial Alzheimer's disease: a serial MRI study. Lancet Neurol. 5, 828–834.

Ritchie, C., Smailagic, N., Noel-Storr, A.H., Takwoingi, Y., Flicker, L., Mason, S.E., et McShane, R. (2014). Plasma and cerebrospinal fluid amyloid beta for the diagnosis of Alzheimer's disease dementia and other dementias in people with mild cognitive impairment (MCI). Cochrane Database Syst. Rev. 6, CD008782.

Robert, P., Lehericy, S., Grand, S., Violas, X., Fretellier, N., Idée, J.-M., Ballet, S., et Corot, C. (2015). T1-weighted hypersignal in the deep cerebellar nuclei after repeated administrations of gadolinium-based contrast agents in healthy rats: difference between linear and macrocyclic agents. Invest. Radiol. 50, 473–480.

Rodríguez-Rodríguez, A. (2014). Diseño de quelatos de lantánidos de alta estabilidad con interés en Imagen Molecular. Universidade da Coruña.

Rodríguez-Rodríguez, A., Esteban-Gómez, D., de Blas, A., Rodríguez-Blas, T., Fekete, M., Botta, M., Tripier, R., et Platas-Iglesias, C. (2012). Lanthanide(III) complexes with ligands derived from a cyclen framework containing pyridinecarboxylate pendants. The effect of steric hindrance on the hydration number. Inorg. Chem. 51, 2509–2521.

Rodríguez-Rodríguez, A., Garda, Z., Ruscsák, E., Esteban-Gómez, D., Blas, A. de, Rodríguez-Blas, T., Lima, L.M.P., Beyler, M., Tripier, R., Tircsó, G., *et al.* (2015).

Stable Mn2+, Cu2+ and Ln3+ complexes with cyclen-based ligands functionalized with picolinate pendant arms. Dalton Trans. 44, 5017–5031.

Roger, M. (2013). Nouveaux chélates [triazacyclononane-métaux de transition]: synthèse, complexation et premières applications. Université de Bretagne Occidentale.

Rohrer, M., Bauer, H., Mintorovitch, J., Requardt, M., et Weinmann, H.-J. (2005). Comparison of magnetic properties of MRI contrast media solutions at different magnetic field strengths. Invest. Radiol. 40, 715–724.

Ronaldson, P.T., Persidsky, Y., et Bendayan, R. (2008). Regulation of ABC membrane transporters in glial cells: relevance to the pharmacotherapy of brain HIV-1 infection. Glia 56, 1711–1735.

Rowinska-Zyrek, M., Salerno, M., et Kozlowski, H. (2015). Neurodegenerative diseases – Understanding their molecular bases and progress in the development of potential treatments. Coord. Chem. Rev. 284, 298–312.

Rudashevskaya, E.L., Stockner, T., Trauner, M., Freissmuth, M., et Chiba, P. (2014). Pharmacological correction of misfolding of ABC proteins. Drug Discov. Today Technol. 12, e87–e94.

Ruiz-Castillo, P., Blackmond, D.G., et Buchwald, S.L. (2015). Rational ligand design for the arylation of hindered primary amines guided by reaction progress kinetic analysis. J. Am. Chem. Soc. 137, 3085–3092.

Runge, V.M. (2016). Safety of the gadolinium-based contrast agents for magnetic resonance imaging, focusing in part on their accumulation in the brain and especially the dentate nucleus. Invest. Radiol. 51, 273–279.

Runge, V.M., Clanton, J.A., Price, A.C., Wehr, C.J., Herzer, W.A., Partain, C.L., et James, A.E. (1985). The use of Gd DTPA as a perfusion agent and marker of blood-brain barrier disruption. Magn. Reson. Imaging 3, 43–55.

Saengkhae, C. (2004). La résistance multiple aux médicaments : détermination des paramètres cinétiques caractéristiques du transport des rhodamines par la P-glycoprotéine et la MRP1 et de la fluorescéine et dihydrofluorescéine par la MRP1. Université Paris 13.

Salloway, S., Sperling, R., Fox, N.C., Blennow, K., Klunk, W., Raskind, M., Sabbagh, M., Honig, L.S., Porsteinsson, A.P., Ferris, S., *et al.* (2014). Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. N. Engl. J. Med. 370, 322–333.

Santin, M.D., Debeir, T., Bridal, S.L., Rooney, T., et Dhenain, M. (2013). Fast in vivo imaging of amyloid plaques using µ-MRI Gd-staining combined with ultrasound-induced blood-brain barrier opening. NeuroImage 79, 288–294.

Sarka, L., Burai, L., Király, R., Zékány, L., et Brücher, E. (2002). Studies on the kinetic stabilities of the Gd(3+) complexes formed with the N-mono(methylamide), N'-mono(methylamide) and N,N"-bis(methylamide) derivatives of diethylenetriamine-N,N,N',N",N"-pentaacetic acid. J. Inorg. Biochem. 91, 320–326.²

Scherrmann, J.-M. (2009). ABC superfamily transporters at the human blood–brain barrier. Dans ABC transporters and multidrug resistance, A. Boumendjel, J. Boutonnat, and J. Robert, éds. (John Wiley & Sons, Inc.), pp. 363–384.

Schipke, C.G., Peters, O., Heuser, I., Grimmer, T., Sabbagh, M.N., Sabri, O., Hock, C., Kunz, M., Kuhlmann, J., Reininger, C., *et al.* (2012). Impact of beta-amyloid-specific florbetaben PET imaging on confidence in early diagnosis of Alzheimer's disease. Dement. Geriatr. Cogn. Disord. 33, 416–422.

Schürer, L., Temesvari, P., Wahl, M., Unterberg, A., et Baethmann, A. (1989). Blood-brain barrier permeability and vascular reactivity to bradykinin after pretreatment with dexamethasone. Acta Neuropathol. (Berl.) 77, 576–581.

Selkoe, D.J. (1991). The molecular pathology of Alzheimer's disease. Neuron 6, 487–498.

Selkoe, D.J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. Physiol. Rev. 81, 741–766.

Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E., et Hyman, B.T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 1, a006189.

Ševčík, R., Vaněk, J., Lubal, P., Kotkovác, Z., Kotek, J., et Hermann, J. (2014) Formation and dissociation kinetics of copper(II) complexes with tetraphosphorus acid DOTA analogs. Polyhedron 67, 449-455.

Shaffer, B.C., Gillet, J.-P., Patel, C., Baer, M.R., Bates, S.E., et Gottesman, M.M. (2012). Drug resistance: still a daunting challenge to the successful treatment of AML. Drug Resist. Updat. 15, 62–69.

Sharom, F.J. (2014). Complex interplay between the P-glycoprotein multidrug efflux pump and the membrane: its role in modulating protein function. Front. Oncol. 4, 41.

Shawahna, R., Uchida, Y., Declèves, X., Ohtsuki, S., Yousif, S., Dauchy, S., Jacob, A., Chassoux, F., Daumas-Duport, C., Couraud, P.-O., *et al.* (2011). Transcriptomic and quantitative proteomic analysis of transporters and drug metabolizing enzymes in freshly isolated human brain microvessels. Mol. Pharm. 8, 1332–1341.

Sherry, A.D., Caravan, P., et Lenkinski, R.E. (2009). A primer on gadolinium chemistry. J. Magn. Reson. Imaging 30, 1240–1248.

Shokeen, M., et Anderson, C.J. (2009). Molecular imaging of cancer with copper-64 radiopharmaceuticals and positron emission tomography (PET). Acc. Chem. Res. 42, 832–841.

Sillerud, L.O., Solberg, N.O., Chamberlain, R., Orlando, R.A., Heidrich, J.E., Brown, D.C., Brady, C.I., Vander Jagt, T.A., Garwood, M., et Vander Jagt, D.L. (2013). SPION-enhanced magnetic resonance imaging of Alzheimer's disease plaques in AβPP/PS-1 transgenic mouse brain. J. Alzheimers Dis. 34, 349–365.

Small, B.J., Gagnon, E., et Robinson, B. (2007). Early identification of cognitive deficits: preclinical Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. Geriatrics 62, 19–23.

Smith, S.V. (2004). Molecular imaging with copper-64. J. Inorg. Biochem. 98, 1874–1901.

Smith, P.A., Proks, P., et Moorhouse, A. (1999). Direct effects of tolbutamide on mitochondrial function, intracellular Ca2+ and exocytosis in pancreatic β-cells. Pflüg. Arch. 437, 577–588.

Sperling, R. (2011). Potential of functional MRI as a biomarker in early Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging 32 Suppl 1, S37-43.

Sperling, R., Aisen, P.S., Beckett, L.A., Bennett, D.A., Craft, S., Fagan, A.M., Iwatsubo, T., Jack., C.R., Kaye, J., Montine, T.J., *et al.* (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. 7, 280–292.

Sperling, R., Mormino, E., et Johnson, K. (2014). The evolution of preclinical Alzheimer's disease: implications for prevention trials. Neuron 84, 608–622.

Squire, L., et Zola-Morgan, S. (1991). The medial temporal lobe memory system. Science 253, 1380–1386.

Srivalli, K.M.R., et Lakshmi, P.K. (2012). Overview of P-glycoprotein inhibitors: a rational outlook. Braz. J. Pharm. Sci. 48, 353–367.

Stanimirovic, D.B., Bani-Yaghoub, M., Perkins, M., et Haqqani, A.S. (2015). Blood-brain barrier models: in vitro to in vivo translation in preclinical development of CNS-targeting biotherapeutics. Expert Opin. Drug Discov. 10, 141–155.

Stelzmann, R.A., Norman Schnitzlein, H., et Reed Murtagh, F. (1995). An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde." Clin. Anat. 8, 429–431.

Szakács, G., Paterson, J.K., Ludwig, J.A., Booth-Genthe, C., et Gottesman, M.M. (2006). Targeting multidrug resistance in cancer. Nat. Rev. Drug Discov. 5, 219–234.

Teipel, S.J., Grothe, M., Lista, S., Toschi, N., Garaci, F.G., et Hampel, H. (2013). Relevance of magnetic resonance imaging for early detection and diagnosis of Alzheimer disease. Med. Clin. North Am. 97, 399–424.

Teodori, E., Dei, S., Martelli, C., et Scapecchi, S. (2010). N,N-bis(cyclohexanol)amine aryl esters: the discovery of a new class of highly potent inhibitors of transporter-dependent multidrug resistance (MDR). Curr. Top. Med. Chem. 10, 1715–1731.

Teodori, E., Martelli, C., Salerno, M., Darghal, N., Dei, S., Garnier-Suillerot, A., Gualtieri, F., Manetti, D., Scapecchi, S., et Romanelli, M.N. (2007). Isomeric N,N-bis(cyclohexanol)amine aryl esters: the discovery of a new class of highly potent P-glycoprotein (Pgp)-dependent multidrug resistance (MDR) inhibitors. J. Med. Chem. 50, 599–602.

Thal, D.R., Rüb, U., Orantes, M., et Braak, H. (2002). Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. Neurology 58, 1791–1800.

Thomas, H., et Coley, H.M. (2003). Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein. Cancer Control 10, 159–165.

Tomaru, A., Takeda-Morishita, M., Maeda, K., Banba, H., Takayama, K., Kumagai, Y., Kusuhara, H., et Sugiyama, Y. (2015). Effects of Cremophor EL on the absorption of orally administered saquinavir and fexofenadine in healthy subjects. Drug Metab. Pharmacokinet. 30, 221–226.

Tondelli, M., Wilcock, G.K., Nichelli, P., De Jager, C.A., Jenkinson, M., et Zamboni, G. (2012). Structural MRI changes detectable up to ten years before clinical Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging 33, 825.e25-36.

Tranquart, F., Bettinger, T., et Hyvelin, J.M. (2014). Ultrasound and microbubbles for treatment purposes: mechanisms and results. Clin. Transl. Imaging 2, 89–97.

Tretter, L., Chinopoulos, C., et Adam-Vizi, V. (1998). Plasma membrane depolarization and disturbed Na+ homeostasis induced by the protonophore carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenyl-hydrazon in isolated nerve terminals. Mol. Pharmacol. 53, 734–741.

Tsuruo, T., Iida-Saito, H., Kawabata, H., Oh-hara, T., Hamada, H., et Utakoji, T. (1986). Characteristics of resistance to adriamycin in human myelogenous leukemia K562 resistant to adriamycin and in isolated clones. Jpn. J. Cancer Res. 77, 682–692.

Uhrovčík, J., Gyeváthová, M., et Lesný, J. (2013). Possibility of the spectrophotometric determination of europium by means of arsenazo III. Nova Biotechnol. Chim. 12, 93–99.

U.S. Food and Drug Administration (2015). FDA evaluating the risk of brain deposits with repeated use of gadolinium-based contrast agents for magnetic resonance imaging (MRI), http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DrugSafety/UCM455390.pdf

Vandenberghe, R., Adamczuk, K., Dupont, P., Laere, K.V., et Chételat, G. (2013). Amyloid PET in clinical practice: its place in the multidimensional space of Alzheimer's disease. NeuroImage Clin. 2, 497–511.

Vanhoutte, G., Dewachter, I., Borghgraef, P., Van Leuven, F., et Van der Linden, A. (2005). Noninvasive in vivo MRI detection of neuritic plaques associated with iron in APP[V717I] transgenic mice, a model for Alzheimer's disease. Magn. Reson. Med. 53, 607–613.

Varnes, A.W., Dodson, R.B., and Wehry, E.L. (1972). Interactions of transition-metal ions with photoexcited states of flavines. Fluorescence quenching studies. J. Am. Chem. Soc. 94, 946–950.

Vasiliou, V., Vasiliou, K., et Nebert, D.W. (2009). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. Hum. Genomics 3, 281–290.

Vilar, S., Chakrabarti, M., et Costanzi, S. (2010). Prediction of passive blood-brain partitioning: straightforward and effective classification models based on in silico derived physicochemical descriptors. J. Mol. Graph. Model. 28, 899–903.

Villemagne, V.L., Pike, K.E., Chételat, G., Ellis, K.A., Mulligan, R.S., Bourgeat, P., Ackermann, U., Jones, G., Szoeke, C., Salvado, O., *et al.* (2011). Longitudinal assessment of Aβ and cognition in aging and Alzheimer disease. Ann. Neurol. 69, 181–192.

Villemagne, V.L., Okamura, N., et Rowe, C.C. (2016). Untangling tau imaging. Alzheimers Dement. Diagn. Assess. Dis. Monit. 4, 39–42.

Viola, K.L., Sbarboro, J., Sureka, R., De, M., Bicca, M.A., Wang, J., Vasavada, S., Satpathy, S., Wu, S., Joshi, H., *et al.* (2015). Towards non-invasive diagnostic imaging of early-stage Alzheimer's disease. Nat. Nanotechnol. 10, 91–98.

Vithanarachchi, S.M., et Allen, M.J. (2013). A multimodal, β-amyloid-targeted contrast agent. Chem. Commun. 49, 4148–4150.

Wadghiri, Y.Z., Sigurdsson, E.M., Sadowski, M., Elliott, J.I., Li, Y., Scholtzova, H., Tang, C.Y., Aguinaldo, G., Pappolla, M., Duff, K., *et al.* (2003). Detection of Alzheimer's amyloid in transgenic mice using magnetic resonance microimaging. Magn. Reson. Med. 50, 293–302.

Wadghiri, Y.Z., Li, J., Wang, J., Hoang, D.M., Sun, Y., Xu, H., Tsui, W., Li, Y., Boutajangout, A., Wang, A., *et al.* (2013). Detection of amyloid plaques targeted by

bifunctional USPIO in Alzheimer's disease transgenic mice using magnetic resonance microimaging. PloS One 8, e57097.

Wang, Y.-X.J. (2015). Current status of superparamagnetic iron oxide contrast agents for liver magnetic resonance imaging. World J. Gastroenterol. 21, 13400–13402.

Wang, H., et Chen, X. (2012). Visualization of copper metabolism by 64CuCl2-PET. Mol. Imaging Biol. 14, 14–16.

Wang, M., Etu, J., et Joshi, S. (2007). Enhanced disruption of the blood brain barrier by intracarotid mannitol injection during transient cerebral hypoperfusion in rabbits. J. Neurosurg. Anesthesiol. 19, 249–256.

Wang, X., Cui, M., Jia, J., et Liu, B. (2015). (99m)Tc-labeled-2-arylbenzoxazole derivatives as potential Aβ imaging probes for single-photon emission computed tomography. Eur. J. Med. Chem. 89, 331–339.

Watanabe, H., Ono, M., Iikuni, S., Yoshimura, M., Matsumura, K., Kimura, H., et Saji, H. (2014). A (68)Ga complex based on benzofuran scaffold for the detection of β-amyloid plaques. Bioorg. Med. Chem. Lett. 24, 4834–4837.

Watanabe, H., Kawasaki, A., Sano, K., Ono, M., et Saji, H. (2016). Synthesis and evaluation of copper-64 labeled benzofuran derivatives targeting β-amyloid aggregates. Bioorg. Med. Chem. 24, 3618–3623.

Wedeking, P., Kumar, K., et Tweedle, M.F. (1992). Dissociation of gadolinium chelates in mice: relationship to chemical characteristics. Magn. Reson. Imaging 10, 641–648.

Ween, M.P., Armstrong, M.A., Oehler, M.K., et Ricciardelli, C. (2015). The role of ABC transporters in ovarian cancer progression and chemoresistance. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 96, 220–256.

Weiss, C.K., Kohnle, M.-V., Landfester, K., Hauk, T., Fischer, D., Schmitz-Wienke, J., et Mailänder, V. (2008). The first step into the brain: uptake of NIO-PBCA nanoparticles by endothelial cells in vitro and in vivo, and direct evidence for their blood–brain barrier permeation. ChemMedChem 3, 1395–1403.

Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S., et Couraud, P.-O. (2009). The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. Biochim. Biophys. Acta 1788, 842–857.

Weksler, B., Romero, I.A., et Couraud, P.-O. (2013) The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. Fluids Barriers CNS 10, 16

Wengenack, T.M., Jack, C.R., Garwood, M., et Poduslo, J.F. (2008). MR microimaging of amyloid plaques in Alzheimer's disease transgenic mice. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 35 Suppl 1, S82-88.

Werner, E.J., Datta, A., Jocher, C.J., et Raymond, K.N. (2008). High-relaxivity MRI contrast agents: where coordination chemistry meets medical imaging. Angew. Chem. Int. Ed Engl. 47, 8568–8580.

Wolfe, J.P., Wagaw, S., et Buchwald, S.L. (1996). An improved catalyst system for aromatic carbon−nitrogen bond formation: the possible involvement of bis(phosphine) palladium complexes as key intermediates. J. Am. Chem. Soc. 118, 7215–7216.

Wong, D.F., Rosenberg, P.B., Zhou, Y., Kumar, A., Raymont, V., Ravert, H.T., Dannals, R.F., Nandi, A., Brasić, J.R., Ye, W., *et al.* (2010). In vivo imaging of amyloid deposition in Alzheimer disease using the radioligand 18F-AV-45 (florbetapir F 18). J. Nucl. Med. 51, 913–920.

Wu, G., Wilson, G., George, J., Liddle, C., Hebbard, L., et Qiao, L. (2016). Overcoming treatment resistance in cancer: Current understanding and tactics. Cancer Lett. in press.

Xia, C.-F., Arteaga, J., Chen, G., Gangadharmath, U., Gomez, L.F., Kasi, D., Lam, C., Liang, Q., Liu, C., Mocharla, V.P., *et al.* (2013). [18F]T807, a novel tau positron emission tomography imaging agent for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. 9, 666–676.

Xie, H., Hu, L., et Li, G. (2010). SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. Chin. Med. J. (Engl.) 123, 1086–1092.

Xu, J., Franklin, S.J., Whisenhunt, D.W., et Raymond, K.N. (1995). Gadolinium complex of tris[(3-hydroxy-1-methyl-2-oxo-1,2-didehydropyridine-4-carboxamido)ethyl]-amine: a new class of gadolinium magnetic resonance relaxation agents. J. Am. Chem. Soc. 117, 7245–7246.

Yanagisawa, D., Amatsubo, T., Morikawa, S., Taguchi, H., Urushitani, M., Shirai, N., Hirao, K., Shiino, A., Inubushi, T., et Tooyama, I. (2011). In vivo detection of amyloid β deposition using 19F magnetic resonance imaging with a 19F-containing curcumin derivative in a mouse model of Alzheimer's disease. Neuroscience 184, 120–127.

Yanagisawa, D., Taguchi, H., Ibrahim, N.F., Morikawa, S., Shiino, A., Inubushi, T., Hirao, K., Shirai, N., Sogabe, T., et Tooyama, I. (2014). Preferred features of a fluorine-19 MRI probe for amyloid detection in the brain. J. Alzheimers Dis. 39, 617–631.

Yang, Y., et Cui, M. (2014). Radiolabeled bioactive benzoheterocycles for imaging β-amyloid plaques in Alzheimer's disease. Eur. J. Med. Chem. 87, 703–721.

Yu, J.-T., Tan, L., et Hardy, J. (2014). Apolipoprotein E in Alzheimer's disease: an update. Annu. Rev. Neurosci. 37, 79–100.

Zeng, F., et Goodman, M.M. (2013). Fluorine-18 radiolabeled heterocycles as PET tracers for imaging β-amyloid plaques in Alzheimer's disease. Curr. Top. Med. Chem. 13, 909–919.

Zetterberg, H., et Schott, J. (2016). Cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease. Dans Immunotherapy and Biomarkers in Neurodegenerative Disorders, M. Ingelsson, et L. Lannfelt, éds. (Springer New York), pp. 153–179.

Zhang, C., Kwan, P., Zuo, Z., et Baum, L. (2012). The transport of antiepileptic drugs by P-glycoprotein. Adv. Drug Deliv. Rev. 64, 930–942.

Zhang, Y., Leonessa, F., Clarke, R., et Wainer, I.W. (2000). Development of an immobilized P-glycoprotein stationary phase for on-line liquid chromatographic determination of drug-binding affinities. J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App. 739, 33–37.

Zheng, H., et Koo, E.H. (2011). Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. Mol. Neurodegener. 6, 27.

Zhou, Z., et Lu, Z.-R. (2013). Gadolinium-based contrast agents for MR cancer imaging. Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol. 5, 1–18.

Zhuang, Z.-P., Kung, M.-P., Wilson, A., Lee, C.-W., Plössl, K., Hou, C., Holtzman, D.M., et Kung, H.F. (2003). Structure-activity relationship of imidazo[1,2-a]pyridines as ligands for detecting beta-amyloid plaques in the brain. J. Med. Chem. 46, 237–243.

« The truth is, most of us discover where we are headed when we arrive »

En vérité, la plupart d'entre nous découvrent où on va quand on y arrive.

Bill Watterson, Calvin & Hobbes