



HAL
open science

Visualisation de l'amyline avec des sondes métalliques pour une imagerie du diabète

Saida Majdoub

► **To cite this version:**

Saida Majdoub. Visualisation de l'amyline avec des sondes métalliques pour une imagerie du diabète. Chimie analytique. Université d'Orléans, 2020. Français. NNT : 2020ORLE3114 . tel-03379537

HAL Id: tel-03379537

<https://theses.hal.science/tel-03379537>

Submitted on 15 Oct 2021

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 D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

Centre de Biophysique Moléculaire – CNRS UPR4301

THÈSE présentée par :

Saida Majdoub

soutenue le : 18 Septembre 2020

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

Discipline/ Spécialité : Chimie

Visualisation de l'amyline avec des sondes métalliques pour une imagerie du diabète

THÈSE dirigée par :

Dr. Eva JAKAB-TOTH

Directrice de Recherche, CNRS, Orléans

Co-encadrants :

Dr. Célia BONNET

Chargée de Recherche, CNRS, Orléans

Dr. Jean-François MORFIN

Ingénieur de Recherche, CNRS, Orléans

RAPPORTEURS :

Dr. Angélique SOUR

Chargée de Recherche, CNRS, Strasbourg

Dr. Olivier SENEQUE

Directeur de Recherche, CEA, Grenoble

JURY :

Dr. Angélique SOUR

Chargée de Recherche, CNRS, Strasbourg

Dr. Olivier SENEQUE

Directeur de Recherche, CEA, Grenoble

Dr. Christelle HUREAU

Directeur de Recherche, CNRS, Toulouse

Pr. Sylvain ROUTIER

Professeur, Université d'Orléans, Orléans

Dr. Eva JAKAB-TOTH

Directrice de Recherche, CNRS, Orléans

Dr. Jean-François Morfin

Ingénieur de Recherche, CNRS, Orléans

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au Centre de Biophysique Moléculaire (CBM) à Orléans. Je tiens à remercier l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) dans le cadre du financement du projet Diva.

Je tiens à remercier également les membres du jury, Dr. Angélique SOUR, Dr. Olivier SENEQUE, Dr. Christelle HUREAU et Pr. Sylvain ROUTIER qui me font l'honneur d'examiner mon travail de thèse.

Eva, je te remercie du fond du cœur pour ton encadrement et ta disponibilité pour discuter de mes résultats et mes idées malgré tes préoccupations et tes responsabilités. Les mots m'échappent pour exprimer ma gratitude d'avoir intégré une équipe comme la tienne. Tu m'as accueilli avec ta passion pour la recherche et j'ai toujours eu ton soutien, ce qui a rendu cette expérience très agréable. J'admire ta maîtrise, ton enthousiasme et ton intégrité, ce que j'apprécie chez toi par-dessus tout, ton côté humain. Enfin, je veux te remercier pour la bienveillance et la confiance que tu m'avais accordées.

Jean-François J-F, c'est grâce à toi que j'ai pu intégrer l'équipe. Merci de m'avoir encadré, soutenu, appris...pendant 4 ans déjà. Merci pour les longues discussions que nous avons eu au labo « tu as fait une CCM ? » « Il faut que ça soit propre ? » « Tu es sûre que c'est propre, .. j'ai vu ton RMN... »... Encore merci pour toutes les versions de corrections que j'ai eu « tu veux la vérité ou ... ? ». J'espère que j'étais un bon élève et que je n'étais pas très pénible, quoi qu'un peu quand même.

Sara LACERDA, tu étais là quand j'avais le plus besoin de toi. Tu étais à l'écoute. Je te remercie pour ton soutien, toutes les discussions que nous avons eues, les explications sur la biodistribution, les conseils... et pour le Kit de l'Etudiant, cela m'a beaucoup aidé ;).

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe, Agnès PALLIER, merci beaucoup pour tout ce que tu m'as appris, tu étais toujours là pour m'aider. Célia, les 4 ans n'ont pas suffi pour qu'on puisse travailler ensemble mais tu m'as toujours aidé avec tes idées et tes propositions pendant nos réunions. Merci.

Je tiens à remercier Pr. Carlos GERALDES pour m'avoir accueilli et encadré dans ses laboratoires à l'université de Coimbra pendant 20 jours pour apprendre la technique de la

STD. Malgré tes cours et tes préoccupations, nous avons pu trouver le temps pour discuter et échanger, merci encore.

Merci à tous les membres de l'équipe, Sandra, William, Fréd, Dounia, Sophie, Fatima, Maamar c'est grâce à toi que j'ai eu cette expérience, merci de m'avoir encouragé à franchir le pas, Patrick, un grand merci pour tout, pour être là à chaque fois que j'avais besoin de toi, « On est une famille », Dis à Hakim MALIKIDOGO merci d'avoir partagé son déjeuner avec moi.

Merci à toutes les personnes avec qui j'ai travaillé au CBM, je remercie Vincent Aucagne pour ses conseils à propos des peptides et du colloque de l'ADOC, Franck Coste pour m'avoir initié au Dichroïsme circulaire et au DLS, Virginie Malard pour le DLS, Guillaume Gabant pour la Masse et Hervé Meudal pour la RMN. Merci à vous tous, vous étiez toujours prêt à partager vos connaissances.

Merci à tous les doctorants avec qui j'ai partagé de bons moments, Skander ABBOUD, je me rappelle encore de la première soirée qu'on a passé chez toi, avec Karolina et la soirée de ton anniversaire, je peux te dire qu'on est content que Grodon ne soit pas toujours présent. Justine et Julien, je vous aime tous les deux, n'hésitez pas à me dire quand vous voulez de bons « petits » plats tunisiens, je les préparerai avec plaisir. Hugo et Daouda, courage à vous, nos discussions vont me manquer. Florian, Flo, je sais tu n'es pas doctorant, un post-doc peut-être, ou pas, bon bref, merci pour les carrés de chocolat, pour les Pims, ne change pas, tu es magnifique.

Je souhaite remercier mes amis Rateb, Salah, MoMo, Najd, Ihsen, Zinouba, Sabrine, pour tous les moments magiques que nous avons partagés ces dernières années et vivement les prochains souvenirs, Rym, merci beaucoup pour tout ce que tu as fait pour moi, merci d'être là, merci pour la coiffure et les bons plans ;), Fatma, Maryouma et Waâd, nos chemins ont pris des virages différents, pendant 5 ans nous avons vécu ensemble comme des sœurs et je suis sûre qu'à notre prochaine réunion, on se rendra compte que rien n'a changé et comme si on n'a jamais été loin l'une de l'autre.

Last but not Least, je ne remercierai jamais assez cette personne, elle m'a toujours soutenu, encouragé même dans les moments les plus sombres, elle a toujours su me remonter la morale. Cette personne est mon âme sœur, le seul mot qui peut la qualifier, Yassine merci d'être dans ma vie, pour le meilleur et pour le pire comme on dit.

Pour finir, je dédie ce travail à mes parents, ma chère maman, Faiza MAJDOUB et mon père Nouredine MAJDOUB en témoignage de ma profonde gratitude et de mon incontestable reconnaissance, pour tous les sacrifices qu'ils ont consentis, toute la confiance qu'ils m'ont accordée et le soutien matériel et moral durant toute ses années. A mon frère Skander et ma sœur Nawel, je vous souhaite tout le bonheur et la réussite dans votre vie professionnelle et familiale.

Pour tous ceux qui m'ont aidé et que j'ai oublié de nommer, Merci.

Abréviation

Abréviations

Å	Anchtrome
AA	Acide Aminé
ABT	Arylbenzothiazole
A β	Amyloïde β
AC	Agent de contraste
APP	l'Amyloïde Precursor Protéine
BHE	Barrière hématoencéphalique
CDCl ₃	Chloroforme deutéré
CH ₂ Cl ₂	Dichlorométhane
CMC	Concentration micellaire critique
CR	Congo Red
Da	Dalton
DC	Dichroïsme circulaire
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
D ₂ O	Oxyde deutéré
DO2A- <i>t</i> Bu <i>cis</i>	1,4-Bis(<i>tert</i> -butoxycarbonylméthyl)-1,4,7,10-tétraazacyclododécane
DO2A- <i>t</i> Bu <i>trans</i>	1,7-Bis(<i>tert</i> -butoxycarbonylméthyl)-1,4,7,10-tétraazacyclododécane
DLS	Dynamic light scattering
DO3A	Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7-triacétique
DOTA	Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique
DTPA	Acide diéthylènetriamine-pentaacétique
HBS	HEPES buffer saline
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
HSA	Human serum albumine
Hz	Hertz
IAPP ou hIAPP	Islet Amyloid Polypeptide
ICP-MS	Inductively coupled plasma-mass spectrometry
IMPY	2-(40-diméthylamino)-phényl-imidazo[1,2-a]pyridine
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IS	Sphère interne
<i>J</i>	Constante de couplage (RMN)

Abréviations

MeOD	Méthanol deutéré
PCTA	3,6,9,15-Tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-triene-3,6,9-triacetic acide
PEG	Polyéthylène glycol
PiB	Pittsburgh Compound B
MA	Maladie d'Alzheimer
NIR	Proche infrarouge
NMRD	Dispersion de la Relaxation Magnétique Nucléaire
OMS	Organisation Mondiale de la santé
OS	Outre sphère
PI	Point isoélectrique
RE	Réticulum endoplasmique
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROS	Reactive oxidatif species
SPR	Surface plasmon resonance
T2DM	Type II Diabetes millitus
TEM	Microscopie électronique en transmission
TEMP	Tomographie par émission monophotonique
TEP	Tomographie par émission de positron
THF	Tetrahydrofurane
THS	Thiofavin-S
ThT	Thioflavin-T
UV	Ultra-violet
Zn	Zinc

Sommaire

Chapitre I : Introduction

1. INTRODUCTION	6
2. LIEN ENTRE DIABETE DE TYPE II ET MALADIES NEURODEGENERATIVES	8
3. PEPTIDES AMYLOÏDES	8
3.1. LE PEPTIDE B-AMYLOÏDE	9
3.2. LE PEPTIDE AMYLINE	10
4. STRUCTURE DES FIBRES AMYLOÏDES ET TOXICITE	11
4.1. FORMATION DE L'AMYLOÏDE	11
4.2. TOXICITE	12
5. INTERACTION AVEC LES IONS METALLIQUES	14
5.1. EFFET DU ZN(II) SUR L'AGREGATION DES PEPTIDES AMYLOÏDES	14
i. Cas de l'A β	14
ii. Cas de l'Amyline	14
5.2. EFFET DU CU(II) SUR L'AGREGATION DES PEPTIDES AMYLOÏDES	15
i. Cas de l'A β	15
ii. Cas de l'amyline	16
5.3. AUTRES METAUX	16
6. INHIBITION DE L'AGREGATION	17
ETAT DE L'ART : TECHNIQUES ET SONDES DE DETECTION	18
7. TECHNIQUES D'IMAGERIE	19
7.1 IMAGERIE TEP	19
7.2 IMAGERIE TEMP	20
7.3 IRM	21
7.3.1 Principe	22
7.3.2 Les Lanthanides	24
i. Propriétés fondamentales	24
7.3.3 Agents de contraste IRM	26
7.3.4 La relaxivité et les mécanismes de relaxation	28
8. AGENTS D'IMAGERIE POUR LA DETECTION DES PLAQUES AMYLOÏDES	31
8.1 PETITES MOLECULES ORGANIQUES	31
8.1.1 Petites molécules utilisées en fluorescence	31
8.1.2 Petites molécules utilisées en imagerie TEP	33
8.1.3 Petites molécules utilisées en imagerie TEMP	39
8.2 AGENTS DE CONTRASTE IRM	40
8.2.1 Exemple de Poduslo ¹⁰⁹	40
8.2.2 Exemple de Bort et al. ¹¹¹	40
8.2.3 Exemple de Vithanarachchi et al. ¹¹²	41
8.2.4 Exemple de Martins et al.	42
8.2.5 Exemple de Marquette et al.	43
8.2.6 Exemple de nanotubes de carbone f-MWNTs fonctionnalisés	43
8.3 TEMP : COMPLEXES METALLIQUES POUR LA DETECTION DES PLAQUES AMYLOÏDES	44

8.4	COMPLEXES METALLIQUES POUR LA DETECTION TEP DES PEPTIDES AMYLOÏDES	47
9.	CONCLUSION	49
10.	OBJECTIFS DE LA THESE	49
11.	BIBLIOGRAPHIE.....	52

Chapitre II : Complexes avec un bras de ciblage - Synthèse et caractérisation

1.	INTRODUCTION	63
2.	SYNTHESE DES LIGANDS L2 ET L3	64
2.1	SYNTHESE DE L'UNITE CIBLANTE : ARYL BENZOTHAZOLE ABT.....	64
2.2	INTRODUCTION DU LINKER.....	65
2.3	INTRODUCTION DU MACROCYCLE.....	66
3.	CARACTERISATION DES COMPLEXES GDL1-3.....	67
3.1	COEFFICIENT DE PARTITION, LOG P.....	67
➤	Les Règles de Lipinski	68
3.2	DETERMINATION DE LA CONCENTRATION MICELLAIRE CRITIQUE (CMC)	69
3.2.2	<i>Techniques de détermination de la CMC</i>	<i>70</i>
3.2.2.1	Relaxométrie	70
i.	Cas de GdL1.....	70
ii.	Cas de GdL2 et GdL3.....	71
iii.	Bilan.....	72
3.2.2.2	UV-Vis	72
i.	Cas du GdL1.....	72
ii.	Cas de GdL2.....	73
iii.	Cas de GdL3.....	74
iv.	Bilan.....	75
3.2.2.3	Fluorescence.....	76
i.	Cas de GdL1.....	76
ii.	Cas de GdL2.....	77
iii.	Cas de GdL3.....	77
iv.	Bilan sur la fluorescence.....	78
3.2.3	<i>Conclusion sur la partie détermination de la CMC.....</i>	<i>78</i>
3.3	DETERMINATION DE LA TAILLE ET DE LA CHARGE DES PARTICULES FORMEES DANS DES SOLUTIONS DE GDL1-3.....	80
3.3.2	<i>Diffusion dynamique de la lumière (DLS)</i>	<i>81</i>
3.3.3	<i>Potentiel Zeta.....</i>	<i>82</i>
3.3.4	<i>Résultats : taille et charge des particules GdL1-3 :</i>	<i>82</i>
4.	CONCLUSIONS.....	84
5.	BIBLIOGRAPHIE.....	86

Chapitre III: Complexes avec un bras de ciblage -Etude des interactions avec des peptides amyloïdes

1.	INTRODUCTION	91
2.	ETUDE DE L’AFFINITE DES GDL1-3 AUX PEPTIDES AMYLOÏDES ET A LA HSA	91
2.1	PRINCIPE DE LA RESONANCE PLASMON DE SURFACE (SPR).....	91
2.2	SPR : MODELE DE LANGMUIR.....	94
2.3	RESULTATS	94

2.4	LINEARISATION DU MODELE DE LANGMUIR (REPRESENTATION DE SCATCHARD)	99
i.	Cas de l'amyline.....	99
ii.	Influence de la charge :	102
2.5	BILAN SUR LES RESULTATS SPR.....	103
3.	ETUDE DE L'AGREGATION DES PEPTIDES EN PRESENCE DE GDL1-3 PAR DICHROÏSME CIRCULAIRE	104
3.1	PRINCIPE DE LA TECHNIQUE	105
3.2	PEPTIDES AMYLOÏDES AMYLINE ET AB ₁₋₄₀	107
3.3	ETUDE DE L'AGREGATION D'AB ₁₋₄₀ EN PRESENCE DE GDL1-3	110
i.	GdL1	111
ii.	GdL2	112
iii.	GdL3	114
3.4	BILAN : AGREGATION DE L'AB ₁₋₄₀	116
3.5	ETUDE DE L'AGREGATION DE L'AMYLINE EN PRESENCE DE GDL1-3.....	116
i.	GdL1	116
ii.	GdL2	118
iii.	Cas de GdL3.....	119
3.6	BILAN : L'AGREGATION DE L'AMYLINE.....	120
4.	ETUDE DE RELAXOMETRIE :.....	121
5.	ETUDE DE BIODISTRIBUTION <i>EX VIVO</i> :.....	123
6.	CONCLUSION	129
7.	BIBLIOGRAPHIE.....	132
<u>Chapitre IV: Complexes avec deux bras de ciblage- Synthèse, caractérisation et étude d'interaction avec des peptides amyloïdes</u>		
1.	INTRODUCTION	137
2.	SYNTHESE DES COMPLEXES GDLCIS ET GDLTRANS	139
2.1	STRATEGIES D'ALKYLATION EN POSITION <i>CIS</i>	139
2.1.1	<i>Utilisation d'une protection temporaire</i>	139
2.1.2	<i>Alkylation statistique directe</i>	140
2.2	STRATEGIES D'ALKYLATION EN POSITION <i>TRANS</i>	141
2.2.1	<i>Variation du pH</i>	141
2.2.2	<i>Stratégie « bisaminal »</i>	142
3.	SYNTHESE DES COMPLEXES.....	143
4.	CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES COMPLEXES.....	144
4.1	COEFFICIENT DE PARTITION, LOG P.....	145
4.2	DETERMINATION DE LA CONCENTRATION MICELLAIRE CRITIQUE (CMC)	146
4.2.1	<i>Techniques de la détermination de la CMC : UV-vis</i>	146
i.	Cas de GdLtrans :.....	146
ii.	Cas de GdLcis	147
4.2.2	<i>Bilan</i>	147
4.2.3	<i>Fluorescence</i>	148
i.	Cas de GdLtrans.....	148
ii.	Cas de GdLcis	149
4.2.4	<i>Conclusion sur la partie détermination de la CMC</i>	149
4.3	DETERMINATION DE LA TAILLE DE GDLCIS ET GDLTRANS PAR LA TECHNIQUE DE DLS	150
4.4	ETUDE DE L'AFFINITE DE GDLTRANS ET DE GDLCIS AUX PEPTIDES AMYLOÏDES.....	151

4.4.1	<i>Cas du peptide Aβ₁₋₄₀.....</i>	151
4.4.2	<i>Cas de l'amyline</i>	151
i.	Modèle de Langmuir	151
ii.	La linéarisation du modèle de Langmuir (représentation de Scatchard).....	154
4.4.3	<i>Conclusion sur les affinités.....</i>	155
4.5	ETUDE DE L'AGREGATION DES PEPTIDES EN PRESENCES DES GDL1-3 PAR SPECTROSCOPIE DE DICHROÏSME CIRCULAIRE	155
4.5.1	<i>Suivi de l'agrégation du peptide Aβ₁₋₄₀ en présence des complexes.....</i>	156
i.	Cas du GdLcis.....	156
ii.	Cas du GdLtrans.....	157
4.5.2	<i>Bilan : Agrégation de l'Aβ₁₋₄₀.....</i>	159
4.5.3	<i>Suivi de l'agrégation du peptide amyline en présence des complexes.....</i>	159
i.	Cas de GdLcis.....	159
ii.	Cas du GdLtrans.....	161
4.5.4	<i>Bilan : Agrégation de l'amyline</i>	162
5.	CONCLUSION	162
6.	BIBLIOGRAPHIE.....	165
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	169
1.	EXPERIMENTAL PROCEDURES AND MATERIALS:.....	175
1.1	SOLVENTS AND REAGENTS:	175
1.2	SYNTHESIS.....	175
1.3	METHODS OF CHARACTERIZATION AND ANALYSIS	198
i.	Mass spectrometry	198
ii.	Complex preparation.....	198
iii.	Log P determination	198
iv.	DLS.....	198
v.	UV-visible spectroscopy.....	199
vi.	Fluorescence studies	199
vii.	Surface plasmon resonance spectroscopy:.....	199
viii.	Circular Dichroism:.....	201
ix.	¹ H NMRD measurements.....	201
1.4	IN-VIVO STUDIES	201
i.	Synthesis of ¹¹¹ In complexes.....	201
ii.	Biodistribution studies.....	202
	ANNEXE.....	205

Chapitre I : Introduction

1. Introduction

Amyloïdose, appelé aussi amylose, est le nom donné aux pathologies impliquant le dépôt de peptides amyloïdes dans les tissus. L'agrégation ou la polymérisation progressive des protéines anormalement pliées est une caractéristique de nombreuses maladies graves. Il s'agit de l'un des biomarqueurs des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer dont 50 millions de personnes sont atteintes selon la fondation Bright Focus pour l'année 2019, ou encore la maladie de Parkinson qui compte entre 7 à 10 millions de personnes malades dans le monde selon les données fournies par l'organisation mondiale de la santé pour l'année en 2015, et ce nombre pourrait doubler d'ici 2040.

Le diabète est une autre pathologie qui implique également un peptide amyloïde, l'amyline, dont les dépôts apparaissent dans le pancréas. Le marché mondial du traitement du diabète a pesé 80 milliards de dollars en 2017, étant le deuxième plus grand marché pharmaceutique après le cancer selon Iqvia¹. Une personne sur 11 dans le monde souffre de cette pathologie chronique. En 2012, 3 millions de français ont été déclarés atteints de Type 2 diabète mellitus (T2DM) avec une hausse estimée de 6% chaque année. 1.5 millions sont décédés suite à des complications liées au diabète. Il s'agit d'un problème de santé majeur dans le monde puisqu'il s'agit de la 1^{ère} cause d'amputation (hors accident) marquant à peu près 8000 cas en France. A nos jours, il n'existe aucun moyen de détection précoce.

Le diabète de type II, appelé aussi diabète non insulino-dépendant ou diabète de l'adulte, est considérée comme l'épidémie du 21^{ème} siècle et touche plus que 90% des personnes atteintes de diabète. Seulement quand des complications apparaissent au niveau du cœur, des vaisseaux sanguins, des yeux, des reins et des nerfs, le sujet est diagnostiqué de diabète de type II, à un stade trop avancé pour des mesures de préventions.

Les principales causes du diabète sont le surpoids et l'obésité, ce qui explique la tendance de l'augmentation d'un facteur de 2 du taux de prévalence entre 1980 et 2014. Ceci se traduit par une augmentation d'un facteur de 4 en termes de nombre de malades (Tableau I.1) selon l'OMS. Les adultes ne sont pas les seuls concernés, les enfants aussi sont victimes de cette pathologie.

Tableau I.1- Prévalence et nombre estimatifs de diabétiques (Adultes de 18 ans ou plus)^{2,3}.

Régions OMS	Prévalence (%)		Nombre (millions)	
	1980	2014	1980	2014
Région Africaine	3.1%	7.1%	4	25
Région des Amériques	5%	8.3%	18	62
Région de la méditerranée orientale	5.9%	13.7%	6	43
Région européenne	5.3%	7.3%	33	64
Région de l'Asie du Sud-Est	4.1%	8.6%	17	96
Région du Pacifique occidental	4.4%	8.4%	29	131
Total	4.7%	8.5%	108	422

Pour lutter contre l'envahissement du diabète, la sensibilisation et la compréhension des phénomènes pathologiques de la maladie sont indispensables. Il est important de mentionner que le diabète de type II est lié à deux principaux facteurs : facteurs génétiques (antécédents familiaux) et facteurs métaboliques. En ce qui concerne les facteurs génétiques, des informations générales peuvent être déduites, le risque est plus élevé pour une personne ayant des parents atteints de diabète par exemple. Les facteurs métaboliques apparaissent suite à un surpoids/ obésité ce qui amplifie le risque d'avoir une hypertension artérielle, du cholestérol, des triglycérides élevés, etc.

Pour faire face à cette épidémie, la recherche s'est multipliée pour trouver un remède et comprendre le processus qui conduit à la résistance du corps par rapport à l'insuline. Dans ce cadre, la co-précipitation des peptides amyloïdes a été mise en évidence. Des plaques ont été retrouvées au niveau du cerveau ainsi qu'au niveau du pancréas. Donc la question qui se pose est : est-ce qu'il y a une relation entre tous les peptides amyloïdes ($A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$, amyline...)? Les plaques de peptides observées dans la pathologie de diabète de type II sont-elles impliquées dans les maladies neurodégénératives ?

Dans ce contexte, des molécules ont été développées pour inhiber l'agrégation de l'amyline⁴⁻⁶ tandis que d'autres ont ciblé la détection des plaques⁷⁻⁹.

Dans ce chapitre introductif, nous avons rassemblé des informations générales sur les peptides amyloïdes et leur phénomène d'agrégation. Ensuite, nous allons présenter un aperçu des techniques d'imagerie et les différentes stratégies de développement des agents d'imagerie pour la détection des plaques amyloïdes, en particulier dans le cas de l' $A\beta_{1-40}$ et l'amyline.

2. Lien entre diabète de type II et maladies neurodégénératives

L'amyline et les peptides A β agissent ensemble et provoquent une accumulation de plaques amyloïdes dans le cerveau. Des études cliniques¹⁰ et animales¹¹ particulièrement sur des modèles de souris transgéniques montrent que l'amyline est impliquée dans la perte neuronale. Ceci indique qu'il existe un lien potentiel entre le diabète de type II et la maladie d'Alzheimer (MA).

Jackson et ses collaborateurs ont conclu, après des études sur des tissus de cerveaux humains issus de patients diabétiques ayant la MA, que l'amyline peut précipiter en formant des plaques d'amyline ou co-précipiter avec l'A β formant des plaques amyloïdes. Selon leurs résultats, l'accumulation des oligomères d'amyline dans le cerveau est un effet direct de l'insulino-résistance pré-diabétique¹². Des études sur des rats exprimant de l'amyline humain dans le pancréas montrent qu'il y a un déficit neuronal associé à une accumulation de l'amyline dans le cerveau, plus précisément sous forme d'oligomères et de dépôts (>50 μ M diamètre)¹³. « Oligomère » est la notation des formes qui sont non-fibrillaires des agrégats de peptides et réfère à un assemblage formé par deux ou plusieurs monomères.

3. Peptides amyloïdes

A nos jours, environ 30 pathologies ont été liés à l'amyloïdogenèse et le repliement anormal de protéines, à savoir la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie d'Huntington, l'angiopathie cérébrale, la sclérose latérale amyotrophique, le diabète type II (Tableau I.2).

Le processus d'agrégation des peptides amyloïdes provoque un dysfonctionnement et, dans certain cas, l'apoptose des cellules et peut conduire jusqu'au dysfonctionnement des organes. L'amyloïdogenèse débute bien avant l'apparition des premiers symptômes cliniques, ce qui permet de la qualifier comme un biomarqueur efficace pour le diagnostic précoce¹⁴.

Tableau I.2 - Maladies amyloïdogéniques et peptides responsables

Pathologies	Peptides ou protéines amyloïdes	Nombre de résidus	Structure à l'état natif
Maladie d'Alzheimer	Amyloïde β , Protéine Tau	40 et/ou 42	Non structuré
Diabète de type II	Amyline	37	Non structurée
Amylose AL	Chaîne légère de l'immunoglobuline	~90	Feuillet β
Amylose de l'hémodialyse	β 2-microglobuline	99	Feuillet β
Amylose systémique sénile	Transthyrétine (TTR)	127	Feuillet β
Amylose secondaire (fièvre méditerranéenne)	Protéine sérum amyloïde A (AA)	76-104	Hélice α
Angiopathie cérébrale	Amyloïde β ($A\beta$)	40 et/ou 42	Non structuré
Maladie de Parkinson	α -synucléine (α -syn)	140	Non structuré
Maladie de Huntington	Protéines polyglutamine	3144	Non structuré

3.1. Le peptide β -amyloïde

Le peptide β -amyloïde est composé essentiellement de 38-43 résidus, formé suite à un clivage protéolytique de l'Amyloïde Precursor Protéine APP par les β - et γ -sécrétases.¹⁵

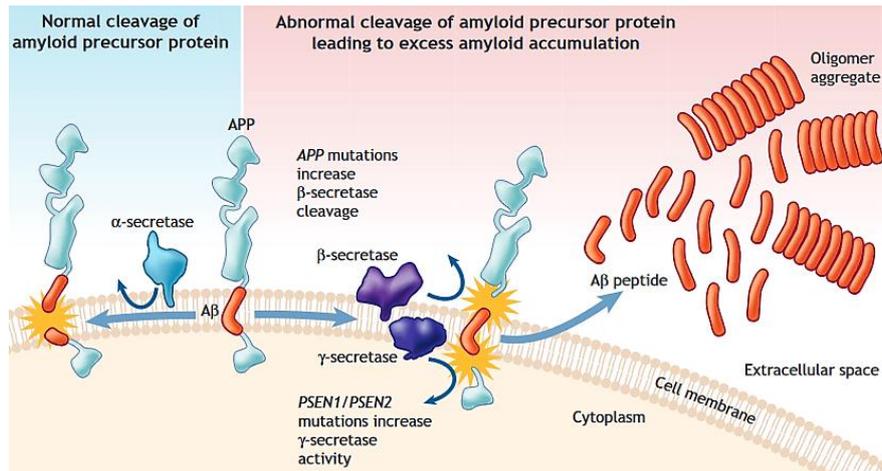


Figure I.1: Voie non-amyloïdogénique (à gauche) et voie amyloïdogénique (à droite) ¹⁶.

Comme nous pouvons le constater au niveau de la voie non-amyloïdogénique sur la Figure I.1, l'enzyme responsable de la coupure de l'APP est l'α-sécrétase. Cette coupure près du domaine transmembranaire va générer un domaine soluble à l'extérieur de la cellule et un fragment qui va rester dans la membrane. Au niveau de la voie amyloïdogénique, la β-sécrétase intervient à son tour pour cliver l'APP, formant d'autres types de fragment. Un des fragments résultants est le substrat de la γ-sécrétase.

Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, le métabolisme de l'APP est modifié. Une augmentation de l'activité de la β-sécrétase entraîne une surproduction du peptide Aβ. L'accumulation de ce dernier conduit à la formation des dépôts amyloïdes. Une perturbation de l'homéostasie des métaux ou un stress oxydant peut contribuer à ces modifications.

La coupure de l'APP conduit généralement à la formation du peptide Aβ₁₋₄₀, cependant, des formes plus au moins longues peuvent se former, notamment l'Aβ₁₋₄₂, qui représentent 5 à 10% des peptides Aβ. Ces derniers sont hydrophobes, donc ont une faible solubilité dans un milieu aqueux, ce qui explique en partie la tendance de ce peptide à s'agréger. Généralement, il s'agit d'un enchevêtrement irréversible de polymère de quelques angströms de long contrairement au reste des polymères biologiques. Il est connu que ce phénomène est sensible à beaucoup d'autres facteurs tel que le pH, la température, la présence d'ions métalliques, la concentration du peptide ...

3.2. Le peptide amyline

L'IAPP, islet amyloid polypeptide ou encore hIAPP (human islet amyloid polypeptide), connu aussi sous le nom d'amyline, est impliqué dans le diabète de type II. Il est constitué de

37 acides aminés (AA); une partie hydrophile de 1-19 AA et une partie amyloïdogénique (la partie qui subit les modifications conformationnelles) de 20-37 AA¹⁷. Ce peptide est une enzyme co-sécrétée avec l'insuline par les cellules β pancréatique dans le cas d'une hyperglycémie. Selon certaines hypothèses, ce peptide a le rôle de diminuer, éventuellement couper l'appétit pour garder un niveau normal de glycémie.

Dans certaines conditions, il change de structure et forme des plaques d'amyline hydrophobes, donc insolubles comme toutes les plaques amyloïdes, même à des concentrations micromolaires. L'accumulation de ces plaques provoque la rupture des membranes des cellules β , donc leur apoptose. Une diminution de 20-40% de la masse des cellules β est détectée dans le cas de diabète installée de longue date.

Il est important à noter qu'il y a une augmentation de la sécrétion de l'amyline chez les personnes obèses et les personnes pré-diabétiques insulino-résistantes.

Dans le cas normal, l'amyline est stocké dans les cellules β à une concentration de 604 à 1 448 pg/mg en poids humide¹⁸ sans formations d'agrégats. Dans le réticulum endoplasmique (RE), les vésicules sécrétrices de l'insuline gardent l'amyline excédant la solubilité maximale dans un milieu aqueux particulier pour prévenir son agrégation. Ce milieu est acide dans la vésicule de Lumen ayant un pH de l'ordre 5,5.

Par contre, le ratio amyline : insuline de 1 :100 chez les sujets sains grimpe à 1 :20 chez les personnes atteintes de diabète de type II¹⁹.

4. Structure des fibres amyloïdes et toxicité

4.1. Formation de l'amyloïde

L'agrégation d'une protéine implique la présence d'un noyau ou des formes intermédiaires appelés aussi monomères, et l'élongation de ces formes en fibrilles dans des conditions bien particulières (pH, taux de Zn(II), stress oxydatif...). La nucléation est une étape importante dans le processus d'agrégation et, dans cette phase, on parle d'un groupe hétérogène d'oligomères. Au cours de cette étape, le taux d'association excède le taux de dissociation. Le produit final est bien un assemblage défini, une fibrille amyloïde (Figure I.2).

La conversion d'une protéine soluble en une protéine insoluble ne dépend pas simplement d'une étape de nucléation primaire, de la croissance et de l'élongation, mais implique aussi un processus secondaire qui dépend du degré d'agrégation survenant à toutes les étapes de la

réaction²⁰. Le changement de structure de la protéine est soumis à un contrôle thermodynamique tandis que l'agrégation de la protéine, elle, est sous contrôle entropique²¹. Les interactions intramoléculaires régissent le repliement tandis que l'agrégation est dominée par des interactions intermoléculaires.

De nos jours, les travaux se poursuivent afin de décrire les différentes espèces qui interviennent dans la formation de l'amyloïde puisqu'il existe plusieurs conformations qui peuplent d'une façon transitoire ce processus.

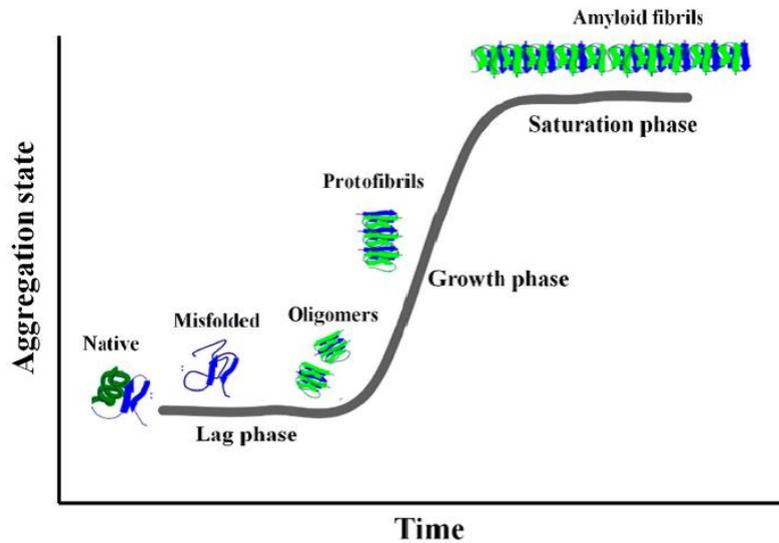


Figure I.2 : Différentes étapes de formation des fibrilles amyloïdes²².

4.2. Toxicité

Les oligomères A β et amyline sont reportés comme les formes toxiques des peptides amyloïdes. Mais le débat entre le fait que les agrégats de l'A β sont responsables du dysfonctionnement synaptique et la perte des neurones et le fait que cette agrégation est une conséquence de la maladie d'Alzheimer reste ouvert. Dans ce qui suit, nous allons nous focaliser sur la toxicité des oligomères amyline²³.

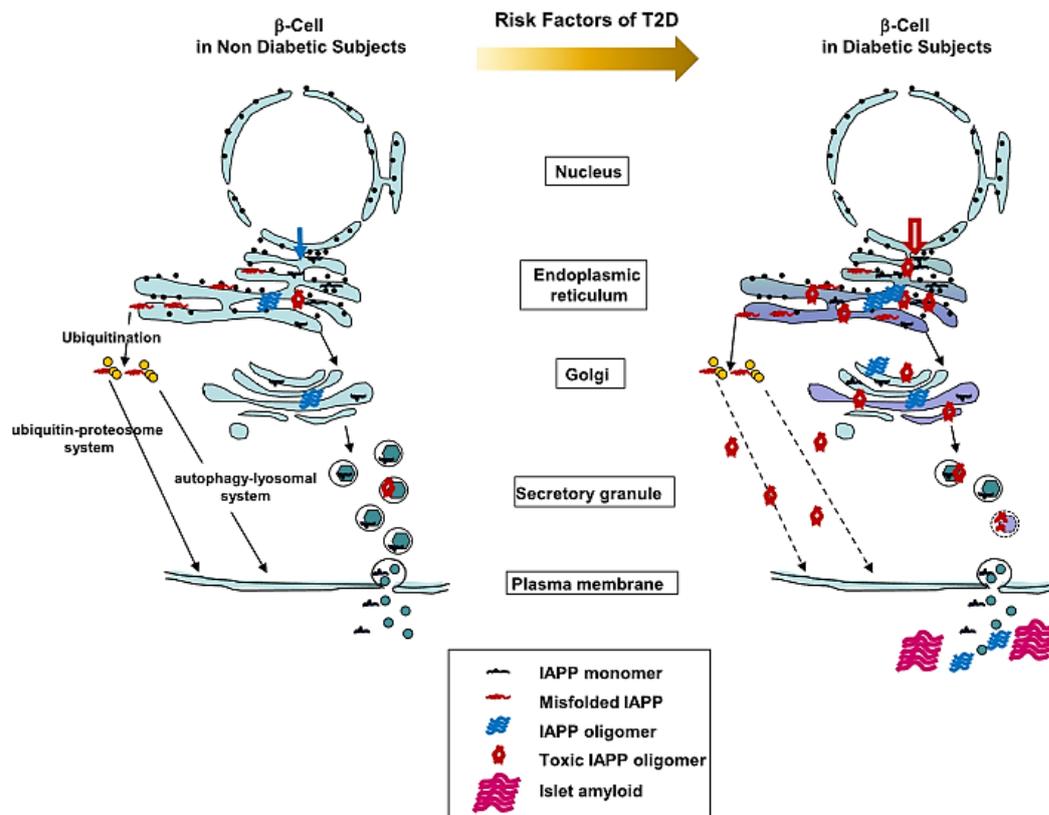


Figure I.3: Différents mécanismes de la formation des oligomères de l’amyline dans le cas sain (à droite) et chez un sujet atteint de T2DM (à gauche)²⁴.

Dans le cas normal, dans le réticulum endoplasmique (RE), les protéines se replient, se modifient et s’assemblent avant de s’engager dans le système de sécrétion. Il existe aussi des protéines qui ne sont pas formés « proprement », ayant des anomalies au niveau des repliements. Ces protéines ne passent pas le système de contrôle cellulaire. Elles sont éliminées dans le cytosol. Ensuite, elles subissent des modifications biochimiques, ayant plusieurs fonctions, dont la plus connue est la dégradation de la protéine et, enfin, une élimination par autophagie (Figure I.3).

Dans le cas où la demande en peptide amyloïde est plus importante que la capacité de production au niveau du RE, les molécules de l’amyline aberrantes s’accumulent au niveau du RE. Quand la réponse aux peptides non repliés et l’autophagie sont réduites, l’accumulation des agrégats augmente encore plus. En d’autres termes, les dépôts sont composés de fibres de protéines normales et anormales (fibrilles), qui s’accumulent plus rapidement qu’elles ne sont éliminées ou désagrégées. Dans les conditions physiologiques normales, les protéines sont éliminées environ au même rythme que leur production. À l’opposé, les protéines qui forment

l'amyloïde sont détruites très lentement. Progressivement, elles interfèrent avec la structure et la fonction des organes affectés. Ces dépôts engendrent ainsi des dommages à la membrane cellulaire, produisant des espèces oxygénées réactives (ROS) et provoquant l'apoptose. Il a été montré que l'interaction de l'amyline avec les membranes cellulaires chargées négativement²⁵ accélère le processus d'agrégation et donc la formation des espèces toxiques et éventuellement des fibrilles provoquant l'apoptose des cellules.

5. Interaction avec les ions métalliques

5.1.Effet du Zn(II) sur l'agrégation des peptides amyloïdes

i. Cas de l'A β

Des concentrations de l'ordre du millimolaires de Zn(II) et de Cu(II) ont été trouvées au niveau des plaques amyloïdes, liées particulièrement aux fibres de peptide A β ^{26,27}. L'interaction du Zn(II) avec l'A β génère plusieurs structures peptidiques qui finissent par avoir un impact sur la formation des plaques amyloïdes. Faller *et al.* ont étudié l'agrégation de plusieurs peptides amyloïdes et en particulier l'A β ₁₋₄₀ et l'A β ₁₋₄₂, dans différentes conditions (variation de la concentration de Zn(II), pH, effet du sel dans le milieu...) et par différentes techniques (TEM, fluorescence (ThT), turbidité, RMN...).

La conclusion tirée de ces expériences est qu'à concentration élevée de Zn(II), ou à un pH proche du pI (théoriquement : pI(A β ₁₋₄₀) =7.1, pI(A β ₁₋₄₂) =5.5) du peptide, ou à très faible ou très forte concentration de sel dans le milieu, l'agrégation du peptide amyloïde est accélérée formant ainsi un précipité de plaque de peptide. Contrairement aux résultats obtenus à faible concentration de métal et à pH différent du PI du peptide, où l'agrégation ne se produit pas. La phase de nucléation est la phase la plus affectée par ces changements de paramètres et, c'est à ce niveau qu'il faut se focaliser pour comprendre le phénomène d'agrégation et l'effet de chaque métal. Cependant, la reproductibilité des résultats reste un problème à relever, bien qu'il soit essentiellement lié au comportement du peptide en formant des structures amorphes au lieu de structures ordonnées dans le cas d'une agrégation rapide du peptide amyloïde.

ii. Cas de l'Amyline

Une déficience en Zn(II) a été détectée au niveau du pancréas chez les patients diabétiques²⁸ et il n'existe pas une explication concrète sur ce phénomène jusqu'à ce jour. Deux hypothèses

ont été développées pour expliquer cette diminution de la concentration du Zn(II). La première hypothèse propose qu'il y a une sorte de mutation au niveau du transporteur du Zn(II); c'est la protéine ZnT8 qui sert à diffuser le zinc à partir des granules sécrétrices des cellules β dans le sang¹⁷.

La deuxième hypothèse stipule que le Zn(II) libre peut coordonner au niveau des monomères, oligomères et fibres d'amyline en produisant des complexes toxiques de zinc-amyline oligomères/ fibres, d'où la diminution du taux de Zn(II) dans le sang.

Pour comprendre plus le phénomène d'agrégation de l'amyline, Durani *et al.*²⁹ ont révélé que le Zn(II) se lie dans une géométrie de coordination plutôt complexe, en tétra, penta et hexaédrique en impliquant ou pas des molécules d'eau. La coordination tétraédrique est la conformation préférentielle pour l'ion Zn(II) qui sera lié à 4 acides aminés ou molécules d'eau.

La même équipe a réussi à prouver que le Zn(II) se lie à la seule histidine que l'amyline possède. Dans ce cas de figure, le Zn(II) promeut l'agrégation de l'ordre de 3 à 4 peptides amyline par cation³⁰. Néanmoins, l'effet du Zn(II) sur l'agrégation de l'amyline dépend également de la concentration, de l'état du peptide au cours du processus d'agrégation et du pH³¹. A 10 mM de Zn(II) et au début de l'agrégation (40min), de larges agrégats de Zn-amyline ont été observés. Cependant, à 100 μ M de métal et au même état d'agrégation de l'amyline (40min), des agrégats encore plus larges de Zn-amyline, que ceux observés à concentration plus élevée de Zn(II), ont été identifiés¹⁷.

De ce fait, le Zn(II) promeut la formation des premiers agrégats qui conduisent à la formation des fibres d'amyline^{30,32}.

5.2.Effet du Cu(II) sur l'agrégation des peptides amyloïdes

i. Cas de l'A β

Il a été prouvé que l'affinité du Cu(II) pour le peptide amyloïde est indépendante de l'état d'agrégation de ce dernier³³. De plus, des études plus récentes ont montré que le peptide amyloïde est en compétition avec l'Albumine Sérique Humaine pour interagir avec le Cu(II)^{34,35}.

Cependant, les mêmes constatations que pour le Zn(II) ont été observées, à forte concentrations de cuivre et à un pH proche du PI du peptide, le peptide précipite. A faibles concentrations et à pH loin du PI du peptide, l'agrégation est inhibée²⁶.

ii. Cas de l'amyline

Beaucoup de recherches portent sur l'influence du cuivre sur l'agrégation de l'amyline et elles convergent vers le même résultat³⁶. Le cuivre inhibe la formation des fibres de l'amyline. Des dimères d'amyline ont été observés en absence du Cu(II) mais pas en présence du Cu(II). Li *et al.* expliquent cette observation par le fait que le Cu(II) se lie préférentiellement au conformère feuillet β . Il existe deux sites de coordination du Cu(II) sur la longueur de la chaîne de l'amyline et, l'un des deux sites est indispensable pour le repliement du peptide (alanine25)³⁷, le deuxième site se situe entre les résidus 32 et 37 proche du C-terminal du peptide.

Des essais d'agrégations en présence de Thioflavin T et Amplex-UltraRED H_2O_2 ¹⁷ pour la détection de l'effet du Cu(II) sur amyline ont montré que les ions Cu(II) stabilisent l'amyline dans sa forme native, non toxique (random coil) ce qui empêche l'amyline de s'agréger après la conformation en feuillet β . La coordination du peptide au cuivre diminue la capacité d'entraîner l'apoptose des cellules β .

5.3. Autres métaux

Plusieurs métaux de transition ont été testés afin d'étudier leurs effets sur l'agrégation de l'amyline.

Dans le cas du Fe(II), la coordination est détectée au niveau du domaine hydrophile du peptide amyline (1-19)¹⁷. De façon générale, le Fe(II) promeut l'agrégation de l'amyline.

Dans le cas du Ni(II), il n'existe pas beaucoup d'études sur son influence sur l'agrégation de l'amyline. Les ions Ni(II) sont connus pour leur capacité de promouvoir la déprotonation des amides et leur coordination à pH élevé¹⁷. Par conséquent, à pH biologique [7.35-7.45], des complexes Ni-amyline ne peuvent pas être formés. En effet, il a été reporté que le Ni(II) peut favoriser l'hyperglycémie en diminuant l'utilisation périphérique du glucose, l'augmentation de la sécrétion du glucagon et la glycolyse hépatique. De plus, des études ont montré que le Ni(II) peut altérer les fonctions des îlots de Langerhans et augmente le niveau de glucose dans le plasma suite au stress oxydatif³⁸.

Des complexes de vanadium (IV, V, VI) ont montré une inhibition remarquable de l'agrégation de l'amyline avec des interactions hydrophobes ou électrostatiques entre le peptide et les complexes selon des résultats de voltamétrie³⁹. Des études plus approfondies ont montré que les complexes de vanadium protègent les cellules de la toxicité induite par les plaques d'amyline³⁹.

6. Inhibition de l'agrégation

Plusieurs stratégies ont été développées pour inhiber l'agrégation des peptides amyloïdes dans un but thérapeutique. Une des stratégies consiste à réduire la quantité de la protéine native en diminuant son niveau d'expression. Une autre vision consiste à perturber les interactions que possèdent les protéines amyloïdogéniques avec leur environnement : les lipides, la matrice extracellulaire (peptidoglycanes) et les protéines chaperonnes (ce sont des protéines qui assistent les autres protéines dans le processus de maturation en évitant leur agrégation^{40,41}).

Les méthodes d'inhibition de la formation des dépôts fibrillaires les plus explorées par la communauté scientifique sont illustrées dans la figure I.4:

- L'inhibition de l'assemblage des protéines en oligomères et en fibrilles
- La stabilisation de la protéine native en une structure non-amyloïdogénique (a)
- L'élimination des dépôts d'amyloïde au sein de l'organe atteint.

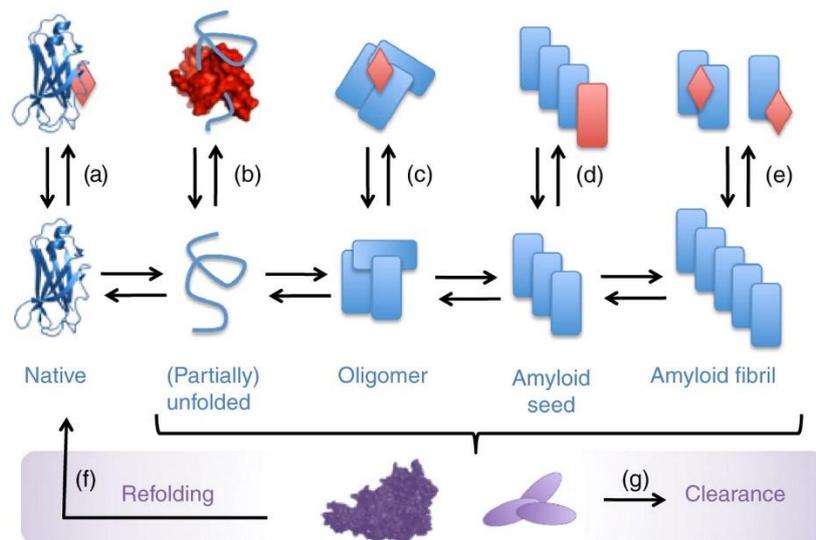


Figure I.4: Différentes stratégies afin de rompre le cycle de la formation d'une fibrille. a) Stabiliser la forme native. b) Séquestrer le monomère. c) Stabiliser ou promouvoir les oligomères inoffensifs. d) Briser les feuillets β , empêchant ainsi l'élongation. e) Désassembler. f) Replier. g) Éliminer les conformations toxiques via chaperonne ou anticorps. Tirée de Hard et Lendel, 2012⁴².

Plusieurs inhibiteurs émergent de ces stratégies et se divisent ainsi en quatre catégories : les petites molécules inhibitrices (Figure I.5), les peptides, les nanoparticules et les anticorps. Leurs mécanismes d'action ne sont pas encore totalement déchiffrés. Néanmoins, les études indiquent la non-spécificité de ces petites molécules à un type d'amyloïde. Par conséquent, en

utilisant des stratégies d'inhibition, il ne faut pas que des molécules inhibitrices s'attaquent à d'autres types de peptides amyloïdes fonctionnels⁴³.

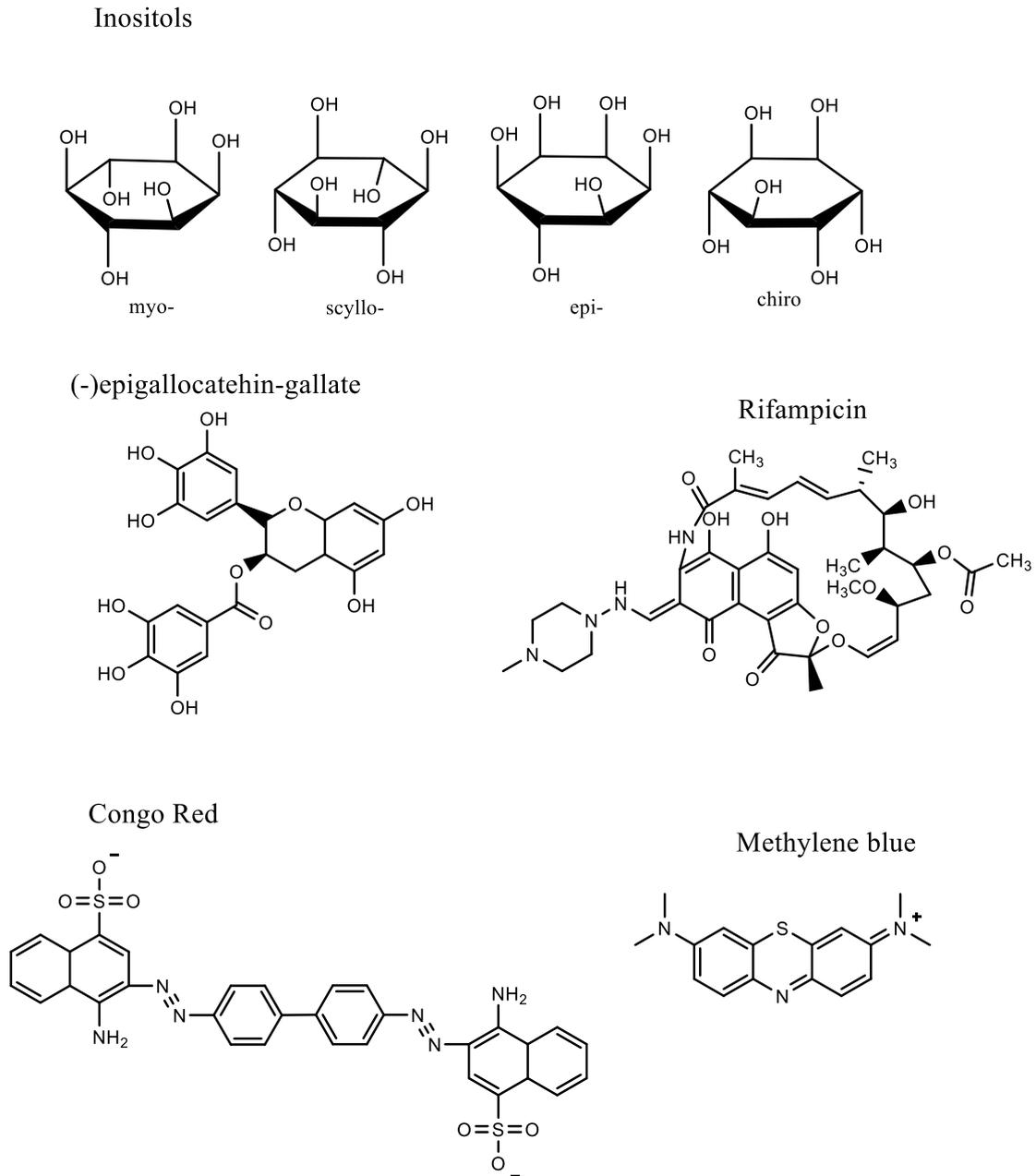


Figure I.5 : Exemples de petites molécules modulatrices de l'agrégation des protéines et de la formation des plaques amyloïdes⁴².

Etat de l'art : techniques et sondes de détection

Dans ce qui suit, nous allons décrire les différentes techniques d'imagerie qui ont été proposées pour la détection des plaques amyloïdes ainsi que les différentes sondes d'imagerie élaborées au cours de ces dernières décennies.

7. Techniques d'imagerie

7.1 Imagerie TEP

La Tomographie par Emission de Positrons ou TEP est une technique d'imagerie nucléaire. Elle nécessite l'utilisation d'un radio traceur, appelé aussi radiopharmaceutique, qui est une molécule ayant une cible bien spécifique afin de comprendre un phénomène biochimique. Ces traceurs sont marqués par un isotope qui est lié soit de façon covalente à la molécule comme dans le cas du PiB marqué au ^{11}C , soit sous forme d'un complexe métallique (complexes de ^{68}Ga par exemple)⁴⁴. Les isotopes TEP sont des émetteurs de positron β^+ appelé aussi un antiélectron, dont l'annihilation produit deux photons γ de 511 keV dans deux sens opposés (180°). Une caméra TEP détecte ces photons et permet ainsi la détermination de la position ainsi que la concentration du traceur à chaque point. Les coïncidences sont converties en images topographiques après le traitement par des algorithmes mathématiques afin de faire une reconstruction 3D du corps.

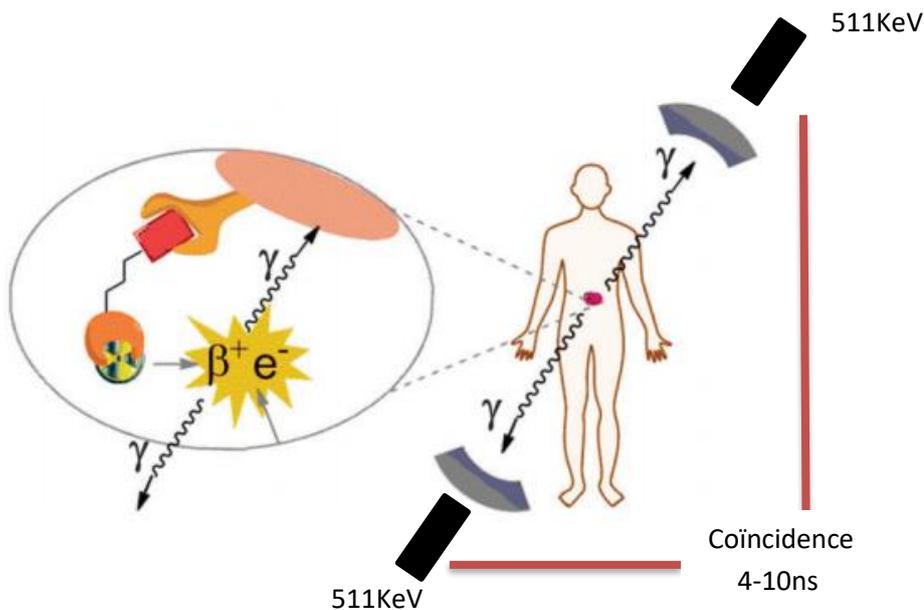


Figure I.6: Principe de la tomographie par émission de positrons (Edité de Caterina *et al.*)⁴⁵.

Les radioisotopes classiquement utilisés en TEP sont présentés dans le Tableau I.3.

La TEP est caractérisée par une très bonne résolution (2-4mm) et la meilleure sensibilité (de l'ordre de 10^{-12}M) comparant de toutes les techniques d'imagerie existantes⁵². Ces caractéristiques sont liées aux propriétés intrinsèques de l'émission β^+ . Plus l'énergie d'émission est faible, meilleure est la résolution.

Tableau I.3- Différents radioisotopes utilisés en TEP et leurs propriétés.

	Radioisotope	Energie (keV)	Temps $\frac{1}{2}$
ISOTOPES NON-METALLIQUES ; RADIOMARQUAGE COVALENT ^{46,47,48,49}	¹¹ C	385.6	1223.1 s
	¹⁸ F	249.8	109.7 min
	¹³ N	491.8	9.9 min
	¹⁵ O	735.2	122.2 s
	¹²⁴ I	687.0 974.7	4.2 d
ISOTOPES METALLIQUES ; RADIOMARQUAGE SOUS FORME DE COMPLEXES ^{50,51,14}	⁸⁹ Zr	395.5	78.4 h
	⁸⁶ Y	535.0	14.7 h
	⁶⁴ Cu	278.2	12.7 h
	⁶⁸ Ga	836.0	67.7 min

7.2 Imagerie TEMP

Une autre technique de médecine nucléaire est la Tomographie par Emission MonoPhotonique (TEMP). La TEMP nécessite un isotope émetteur γ . Pour la détection des rayonnements, des γ -caméras tournent autour du patient afin de construire des images 3D. Bien évidemment, la sonde injectée doit avoir une cible bien déterminée.

Les photons émis partent dans tous les sens, une des raisons pour laquelle les γ -caméras tournent autour du patient, mais aussi un collimateur géométrique est mis en place pour rétrécir les directions des rayonnements γ .

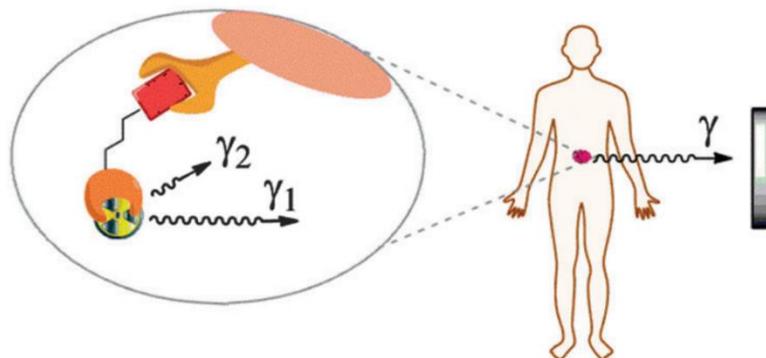


Figure I.7: Principe de la Tomographie par Emission Monophotonique ⁴⁵.

Les photons qui partent dans les directions non contrôlées par le collimateur ne seront pas comptabilisés, ce qui réduit la sensibilité de cette technique par rapport au TEP⁵³. Cependant, la TEMP possède une meilleure résolution spatiale que le TEP.

Les radionucléides typiquement utilisés en TEMP émettent des rayons d'énergies variant de 30 à 300 keV, ils sont caractérisés par une durée de demi-vie plus longue (Tableau I.4), de l'ordre des heures à quelques jours et surtout par une meilleure disponibilité. Le plus utilisé est le ^{99m}Tc avec une demi-vie de 6h et une énergie de 140 keV.

Tableau I.4 - Des radionucléides utilisés en TEMP et leurs propriétés

	Radionuclide	Energie (keV)	Temps ½
ISOTOPES METALLIQUES ; RADIOMARQUAGE SOUS FORME DE COMPLEXES ^{14,54,55}	^{99m} Tc	140	6.02h
	¹¹¹ In	171.245	2.8j
	⁶⁷ Ga	93	78.2h
ISOTOPES NON- METALLIQUES ; RADIOMARQUAGE COVALENT ^{56, 57}	¹³¹ I	364	8.02j
	¹²³ I	159	13.2h

La TEMP est la seule technique où l'injection d'un cocktail de radionucléides est possible afin de suivre différents phénomènes moléculaires simultanément puisque chaque radiotraceur γ possède son propre spectre. Typiquement, la concentration de radiotraceur détectable dans le corps est de l'ordre du picomolaire grâce aux instruments modernes.

7.3 IRM

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est devenue l'incontournable technique d'imagerie dans le domaine du diagnostic médical moderne. Elle est basée sur la mesure des temps de relaxation nucléaire des protons de l'eau dans l'organisme. En effet, le corps humain est composé de 70% d'eau donc le ¹H est assez abondant et sensible en RMN.

Des altérations structurelles ou fonctionnelles comme l'atrophie, le dysfonctionnement vasculaire et les altérations des volumes des organes peuvent être observées sur des images IRM. L'intensité recueillie dépend de la densité et des propriétés magnétiques du proton à l'endroit imagé. L'IRM est une technique non-invasive et possède une excellente résolution

spatiale par rapport aux techniques d'imagerie nucléaire. Traditionnellement, l'IRM produit des images anatomiques. Aujourd'hui, l'imagerie moléculaire devient également possible, où à l'aide d'agents de contraste spécifiques, on peut visualiser des biomarqueurs ou des phénomènes moléculaires.

7.3.1 Principe

L'IRM est basée sur les principes de la résonance magnétique nucléaire.

La résonance magnétique nucléaire est une propriété de certains noyaux atomiques possédant un spin nucléaire, par exemple ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{17}O ... En absence d'un champ magnétique, les moments magnétiques (μ_{eff}) ne sont pas orientés, ils sont répartis d'une façon aléatoire. Une fois soumis à un champ magnétique fixe (\vec{B}_0) suivant l'axe Oz, ces moments magnétiques vont s'aligner selon sa direction (état d'équilibre).

La fréquence de la précession des moments magnétiques autour du champ \vec{B}_0 est donnée par l'équation de Larmor :

$$\nu_0 = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \quad \text{I.1}$$

Avec :

ν_0 : la fréquence de précession du noyau, proportionnelle au champ B_0

γ : le rapport gyromagnétique, spécifique à chaque noyau.

Dans une expérience RMN, une onde radiofréquence \vec{B}_1 vient perturber l'état d'équilibre établi. Par conséquent, les moments magnétiques vont résonner et précesser autour de ce nouveau champ. Ce champ est appliqué dans le plan xOy selon l'axe des x.

En absence de la perturbation par la radiofréquence, les moments magnétiques vont retourner à l'équilibre. Ce retour, appelé relaxation, est caractérisé par l'émission d'une onde électromagnétique (détectée sous forme de FID (Free Induction Decay)). Le traitement de ce signal par le transformé de Fourier donne le spectre RMN habituel.

En IRM, pour obtenir une image 2D ou 3D, on utilise un codage spatial de l'échantillon. Pour localiser les signaux des noyaux dans l'espace, nous utilisons des gradients de champ. Ces gradients ont la même direction que \vec{B}_0 mais à des fréquences plus faibles. Un gradient est une variation linéaire du champ magnétique en fonction de sa position dans l'espace.

Chapitre I : Introduction

De ce fait, la relation de Larmor tient compte de chacune des directions dans l'espace (x,y,z) et devient :

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

Pour acquérir des images en IRM, différentes séquences de pulse sont utilisées. Il s'agit d'une combinaison d'impulsions de RF et de gradient de champ magnétique.

Il existe deux types de relaxation des moments magnétiques: la relaxation longitudinale selon l'axe z et la relaxation transversale selon l'axe xy.

Le temps de relaxation longitudinale, T_1 , caractérise le retour à l'équilibre des moments magnétiques sur l'axe Oz.

$$M_z = M_0(1 - e^{-t/T_1}) \quad \text{I.3}$$

Ce retour à l'équilibre est aussi appelé relaxation spin-réseau et caractérisé par une émission de l'énergie absorbée lors de l'excitation. Chaque noyau dans une structure moléculaire donnée possède un T_1 qui lui est caractéristique. Les solutions ont un T_1 plus élevé que les solides.

Le temps de relaxation transversale T_2 caractérise le retour à l'équilibre des moments magnétiques sur l'axe xy.

$$M_{xy} = M_0 e^{-t/T_2} \quad \text{I.4}$$

Cette relaxation spin-spin existe suite à l'interaction des spins des protons entre eux sans transfert d'énergie.

L'intensité du signal sur les images IRM dépend des temps de relaxation T_1 et T_2 ainsi que de la densité des protons. La différence de temps de relaxation des différents tissus peut ne pas être suffisante pour observer un contraste suffisant sur les images. Il est possible d'améliorer le contraste en injectant un agent de contraste. Ce sont des complexes de métaux paramagnétiques ou les substances superparamagnétiques comme les oxydes de fer qui ont la capacité de réduire les temps de relaxation du proton dans les tissus environnants et ainsi améliorer le contraste sur les images.

Depuis 1986, des agents de contraste ont été utilisés dans des dizaines de millions d'exams IRM. Aujourd'hui, tous les agents cliniques sont des complexes de Gd(III), un cation dans la série des lanthanides.

7.3.2 Les Lanthanides

i. Propriétés fondamentales

Il s'agit des 15 éléments du tableau périodique allant du lanthane ($Z=57$) au lutécium ($Z=71$) possédant **des propriétés chimiques semblables**.

Ces éléments ont été extraits d'abord sous forme d'oxydes ressemblant aux alcalino-terreux à partir des minéraux peu connus. Leur similarité chimique résulte de leur structure électronique qui est identique pour les couches extérieures et ne diffère d'un élément au suivant que par addition d'un électron dans la couche profonde 4f.

Le tableau périodique des éléments chimiques est présenté ci-dessous. Les lanthanides (série des lanthanides) sont indiqués en rouge et les actinides (série des actinides) en noir. Les éléments sont classés par numéro atomique (Z) et nom.

1 H 1.008 Hydrogène																	2 He 4.002602 Hélium
3 Li 6.94 Lithium	4 Be 9.012182 Béryllium											5 B 10.81 Bore	6 C 12.011 Carbone	7 N 14.007 Azote	8 O 15.999 Oxygène	9 F 18.99847363 Fluore	10 Ne 20.1797 Neon
11 Na 22.98976928 Sodium	12 Mg 24.304 Magnésium											13 Al 26.9815385 Aluminium	14 Si 28.0855 Silicium	15 P 30.973761998 Phosphore	16 S 32.06 Soufre	17 Cl 35.45 Chlore	18 Ar 39.948 Argon
19 K 39.0983 Potassium	20 Ca 40.078 Calcium	21 Sc 44.955912 Scandium	22 Ti 47.88 Titane	23 V 50.9415 Vanadium	24 Cr 51.9961 Chrom	25 Mn 54.938044 Manganèse	26 Fe 55.845 Fer	27 Co 58.933194 Cobalt	28 Ni 58.6934 Nickel	29 Cu 63.546 Cuivre	30 Zn 65.38 Zinc	31 Ga 69.723 Gallium	32 Ge 72.6305 Germanium	33 As 74.921595 Arsenic	34 Se 78.9718 Sélénium	35 Br 79.904 Brome	36 Kr 83.796 Krypton
37 Rb 85.4678 Rubidium	38 Sr 87.62 Strontium	39 Y 88.90584 Yttrium	40 Zr 91.224 Zirconium	41 Nb 92.90637 Niobium	42 Mo 95.94 Molybdène	43 Tc 98.90625 Technetium	44 Ru 101.07 Ruthénium	45 Rh 102.90550 Rhodium	46 Pd 106.42 Paladium	47 Ag 107.8682 Argent	48 Cd 112.414 Cadmium	49 In 114.818 Indium	50 Sn 118.710 Étain	51 Sb 121.757 Antimoine	52 Te 127.60 Tellure	53 I 126.90447 Iode	54 Xe 131.29 Xénon
55 Cs 132.90545196 Césium	56 Ba 137.327 Baryum	57-71 *Lanthanide series	72 Hf 178.49 Hafnium	73 Ta 180.94788 Tungstène	74 W 183.84 Wolfram	75 Re 186.207 Rhenium	76 Os 190.23 Osmium	77 Ir 192.222 Iridium	78 Pt 195.084 Platine	79 Au 196.966569 Or	80 Hg 200.59 Mercure	81 Tl 204.38 Thallium	82 Pb 207.2 Plomb	83 Bi 208.980386 Bismuth	84 Po 209 Polonium	85 At 210 Astatine	86 Rn 222 Radon
87 Fr 223 Francium	88 Ra 226 Radium	89-103 **Actinide series	104 Rf 261 Rutherfordium	105 Db 262 Dubnium	106 Sg 263 Seaborgium	107 Bh 264 Bohrium	108 Hs 265 Hassium	109 Mt 266 Meitnerium	110 Ds 271 Darmstadtium	111 Rg 272 Roentgenium	112 Cn 285 Copernicium	113 Uut 284 Ununtrium	114 Fl 289 Flerovium	115 Uup 288 Ununpentium	116 Lv 293 Livermorium	117 Uus 294 Unseptium	118 Uuo 294 Oganeson
			57 La 138.9047 Lanthanum	58 Ce 140.12 Cérium	59 Pr 140.90766 Praseodyme	60 Nd 144.24 Néodyme	61 Pm 144.9126 Prométhée	62 Sm 150.36 Samarium	63 Eu 151.964 Europium	64 Gd 157.25 Gadolinium	65 Tb 158.92534 Terbium	66 Dy 162.50 Dysprosium	67 Ho 164.93032 Holmium	68 Er 167.259 Erbium	69 Tm 168.93002 Thulium	70 Yb 173.054 Ytterbium	71 Lu 174.967 Lutécium
			89 Ac 227 Actinium	90 Th 232.0377 Thorium	91 Pa 231.03688 Protactinium	92 U 238.02891 Uranium	93 Np 237 Neptunium	94 Pu 244 Plutonium	95 Am 243 Americium	96 Cm 247 Curium	97 Bk 247 Berkélium	98 Cf 251 Californium	99 Es 252 Einsteinium	100 Fm 257 Fermium	101 Md 288 Mendelevium	102 No 289 Nobelium	103 Lr 260 Lawrencium

Figure I.8: Tableau périodique des éléments chimiques

Le degré d'oxydation habituel des ions lanthanides est III et correspond à une configuration électronique $[Xe] 5d^0 6s^0 4f^n$. Quelques éléments de la série peuvent être stabilisés au degré d'oxydation +II (samarium, europium, ytterbium) ou +IV (cérium, praséodyme, terbium). En conséquence de leur structure électronique à l'état d'oxydation +III, la taille de l'ion (rayon ionique) décroît le long de la série, phénomène appelé contraction des lanthanides.

La couche électronique externe $5s^2 5p^6$ des Ln(III) est complète ce qui fait que ces cations sont peu polarisables. Par conséquent, ils ne peuvent pas former des liaisons covalentes. L'interaction métal-ligand est donc décrite par un modèle purement ionique. De plus les lanthanides sont des acides durs dans la classification de Pearson⁵⁸ et interagissent de préférence avec des ligands durs contenant notamment des atomes d'oxygène donateurs (eau, carboxylates, phosphonates...). Les lanthanides sont également des acides forts au sens de Lewis⁵⁹, ce qui conduit à la déprotonation des molécules d'eau coordonnées aux cations

métalliques ainsi qu'à la formation, à partir d'un pH de 6.5 environ, d'espèces hydroxo $\text{Ln}(\text{OH})_3$ insolubles.

Le La(III) et le Lu(III) ayant une couche 4f, respectivement vide et pleine, sont des métaux diamagnétiques. Les autres cations Ln(III) contiennent tous des électrons non appariés et sont paramagnétiques. Les propriétés magnétiques de lanthanides sont dominées par la répulsion électronique et dans une moindre mesure par le couplage spin-orbite. Le moment magnétique (μ_{eff}) des ions lanthanides est essentiellement indépendant de l'environnement, exprimé en fonction du moment quantique angulaire total J et est donné par l'équation **I.5**⁶⁰ avec le facteur de Landé (g_J) donné par l'équation **I.6**:

$$\mu_{\text{eff}} = g_J \sqrt{J(J+1)} \quad \text{I.5}$$

$$g_J = \frac{3}{2} + \frac{S(S+1) - L(L+1)}{2J(2J+1)} \quad \text{I.6}$$

Le tableau I.5 montre que même si les lanthanides ont des propriétés chimiques similaires, ils sont caractérisés par des propriétés magnétiques différentes. En particulier, le gadolinium se distingue dans cette famille par ses propriétés magnétiques. En effet, les sept électrons non appariés ($S=7/2$) lui confèrent un moment magnétique élevé. La symétrie de son état orbital S lui permet de présenter un temps de relaxation électronique long ($T_{1e} > 10^{-9}$ s) en comparaison avec d'autres lanthanides paramagnétiques ($\sim 10^{-13}$ pour Eu^{3+} , Yb^{3+} et Dy^{3+})⁶¹. Ces deux propriétés sont à l'origine d'un couplage dipolaire efficace entre le moment magnétique du Gd(III) et le moment magnétique des protons à proximité qui induit une augmentation de la vitesse de relaxation de ces protons. De ce fait, les complexes de Gd(III) sont largement utilisés comme agents de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique.

Tableau I.5- Principales caractéristiques des ions libres des éléments du groupe des lanthanides

Ion 4f	$2S+1L_J$	L	S	J	gJ	m_0 (μ_B)	m_{eff} (μ_B)
Ce ³⁺ (4f ¹)	² F _{5/2}	3	1/2	5/2	6/7	2,14	2,54
Pr ³⁺ (4f ²)	³ H ₄	5	1	4	4/5	3,20	3,58
Nd ³⁺ (4f ³)	⁴ I _{9/2}	6	3/2	9/2	8/11	3,27	3,62
Pm ³⁺ (4f ⁴)	⁵ I ₄	6	2	4	3/5	2,40	2,68
Sm ³⁺ (4f ⁵)	⁶ H _{5/2}	5	5/2	5/2	2/7	0,71	0,85
Eu ³⁺ (4f ⁶)	⁷ F ₀	3	3	0	–	0	0
Gd ³⁺ (4f ⁷)	⁸ S _{7/2}	0	7/2	7/2	2	7,00	7,94
Tb ³⁺ (4f ⁸)	⁷ F ₆	3	3	6	3/2	9,00	9,72
Dy ³⁺ (4f ⁹)	⁶ H _{15/2}	5	5/2	15/2	4/3	10,00	10,65
Ho ³⁺ (4f ¹⁰)	⁵ I ₈	6	2	8	5/4	10,00	10,61
Er ³⁺ (4f ¹¹)	⁴ I _{15/2}	6	3/2	15/2	6/5	9,00	9,58
Tm ³⁺ (4f ¹²)	³ H ₆	5	1	6	7/6	7,00	7,56
Yb ³⁺ (4f ¹³)	² F _{7/2}	3	1/2	7/2	8/7	4,00	4,53

7.3.3 Agents de contraste IRM

Le gadolinium serait toxique en conséquence de sa tendance à s'hydrolyser au pH physiologique et de son rayon ionique similaire à celui du Ca(II)⁶². Ce qui peut conduire à une substitution du Ca(II) par le Gd(III). Il faut alors chélater le Gd(III) dans des complexes thermodynamiquement stables et cinétiquement inertes. Les agents de contraste commerciaux sont tous des complexes de Gd(III) formés avec des ligands linéaires ou macrocycliques (Figure I.9). Ces agents de contraste ne sont pas spécifiques, après injection intraveineuse, ils quittent le compartiment sanguin et se distribuent de façon uniforme dans l'espace extracellulaire. 95% de la dose injectée est éliminée 24h après injection essentiellement par voie rénale⁶³.

Suite aux interrogations récentes sur leur toxicité étant donné leur plus faible inertie et un relargage potentiel du Gd(III) la majorité des agents de contraste linéaires ont été suspendus du marché en juillet 2017⁶⁴. En effet, des métaux endogènes comme le Zn(II)⁶⁵ et le Cu(II) peuvent donner lieu à des réactions de transmétallation et ainsi libérer le Gd(III). Le risque de la dissociation du complexe est particulièrement élevé dans le cas des patients atteints de pathologies rénales conduisant à une élimination plus lente de l'agent de contraste. Le Gd(III)

libre peut interagir avec les protéines du sérum ou avec les anions endogènes pour se déposer sous forme de sels insolubles sur les os, le foie et la rate. Des études récentes montrent également l'accumulation du Gd(III) au niveau du cerveau chez des patients non atteints de pathologies rénales suite à plusieurs examens IRM avec des injections d'agents de contraste^{66, 67}. Il a été proposé que la transmétallation avec du Zn(II) ou du Fe(II) est à l'origine de ces dépôts dans le cas des chélates linéaires⁶⁶. Ce risque n'est pas observé dans le cas des agents macrocycliques qui assurent une stabilité thermodynamique et une inertie cinétique plus élevées que celles des ligands linéaires⁶⁸.

Nom générique	gadopentetate dimeglumine	gadoterate meglumine
Nom commercial	Magnevist® (Shering)	Dotarem® (Guerbet)
Agent chélatant	Gd-DTPA	Gd-DOTA
Structure	linéaire	macrocyclique
Date de mise sur le marché	1988	1989

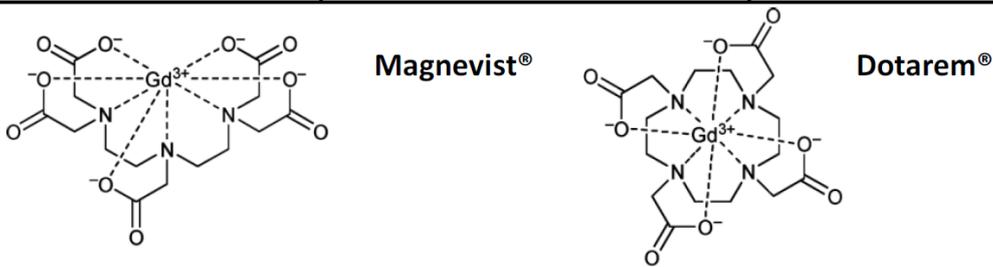


Figure I.9: Deux exemples d'agents de contraste commerciaux à base de gadolinium (adapté de Hermann *et al.*)⁶⁹.

Il est primordial d'éviter toute toxicité induite par le relargage du gadolinium. La toxicité peut être prédite par deux paramètres, la stabilité thermodynamique et l'inertie cinétique. La constante de stabilité thermodynamique, K_{ML} , d'un complexe est définie par l'Equation **I.7** :

$$K_{ML} = \frac{[ML]}{[M][L]} \quad \mathbf{I.7}$$

Avec :

[M] : La concentration d'équilibre de l'ion métallique libre

[L] : La concentration d'équilibre du ligand

[ML] : La concentration d'équilibre du complexe

Les constantes de protonation du ligand K_i sont nécessaires pour le calcul de constante de stabilité du complexe (Equation **I.8**)

$$K_i = \frac{[HiL]}{[H_{i-1}L][H^+]} \quad \mathbf{I.8}$$

La stabilité thermodynamique n'est pas suffisante pour évaluer la toxicité d'un complexe, l'inertie cinétique est aussi importante. Généralement, elle est caractérisée par le temps de demi-vie de dissociation $t_{1/2}$.

La différence des valeurs de temps de demi-vie de dissociation est énorme entre Gd(DTPA) comme étant la structure linéaire avec un $t_{1/2}$ de l'ordre de secondes, et Gd(DOTA) comme étant une structure macrocyclique, avec un temps de demi-vie de 60.2h (Tableau I.6).

Tableau I.6 : Temps de demi-vie en milieu acide ($[H^+] = 0.1$ M, à 25°C) et constantes de stabilité des complexes de Gd(III) ⁷⁰.

Complexe	$t_{1/2}$	$\log K_{GdL}(25^\circ C)$
Gd(DO2A) ⁷¹	-	26.89 ^a 27.57 ^b
Gd(DO3A-monoamide) ⁷²	-	21.29 ^c
Gd(DOTA) (Dotarem®)	60.2h	24.7 ^d
Gd(DTPA) (Magnevist®)	25.56min	22.46 ⁷⁰

a) 0.1 M Me₄NCl b) 1.0 M Me₄NCl c) KCl 1.0M d) 0.1M NaCl

7.3.4 La relaxivité et les mécanismes de relaxation

L'efficacité d'un agent de contraste est définie par sa relaxivité, r_L , en unité mM⁻¹ s⁻¹. La relaxivité correspond à l'augmentation paramagnétique de la vitesse de la relaxation longitudinale ($1/T_{1,p}$), observée pour une solution aqueuse de 1mM de l'agent. Ce paramètre varie en fonction du champ magnétique et de la température. La relaxation nucléaire dans des solutions de complexes paramagnétiques est décrite par la théorie de Solomon-Bloembergen-Morgan.^{73,74,75,76,71}

La relaxivité est déterminée selon les équations suivantes,

$$\frac{1}{T_{1,obs}} = \frac{1}{T_{1,d}} + \frac{1}{T_{1,p}} \quad \mathbf{I.9}$$

$$r_1 = \frac{1}{T_{1,p}} \times \frac{1}{[\text{Gd}]} \quad \text{mM}^{-1}\text{s}^{-1} \quad \text{I.10}$$

Où $1/T_{1,\text{obs}}$ et $1/T_{1,d}$ sont, respectivement, la vitesse de relaxation du proton de l'eau en présence et en absence de l'agent paramagnétique, et $[\text{Gd}]$ est la concentration du Gd(III).

La relaxivité est la somme des différentes contributions, $r_{1\text{IS}}$, $r_{1\text{OS}}$, $r_{1\text{SS}}$, qui correspondent à des mécanismes de relaxation de la sphère interne (IS), de la sphère externe (OS) et de la seconde sphère (SS) :

$$r_1 = r_1^{\text{IS}} + r_1^{\text{OS}} + r_1^{\text{SS}} \quad \text{I.11}$$

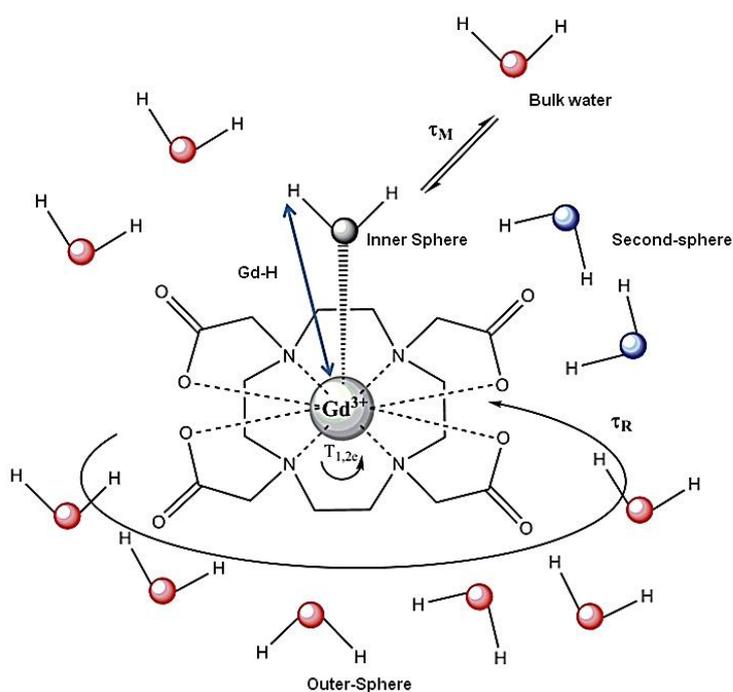


Figure I.10: Représentation d'un complexe de Gd(III) avec une molécule d'eau dans la sphère interne (noir), des molécules d'eau dans la sphère externe (bleu) et des molécules d'eau dans la seconde sphère (rouge)⁷⁷.

La contribution de la sphère interne est liée aux molécules d'eau directement coordonnées au centre métallique qui sont en échange avec les molécules d'eau environnantes. La contribution de la sphère externe concerne les molécules d'eau qui diffusent autour du centre paramagnétique. La contribution de la deuxième sphère est liée aux molécules d'eau assez proches pour former des liaisons hydrogènes avec le ligand ou la molécule d'eau coordonnée à l'ion paramagnétique. Cette dernière contribution est plus difficile à définir précisément car

on ne peut qu'estimer le nombre de molécules d'eau impliquées et leur distance du Gd(III). Dans la plupart des cas, ce mécanisme n'est pas très important, donc négligé dans l'analyse des relaxivités.

Le mécanisme de la sphère interne est le plus important pour le chimiste car il est possible de le maximiser via des modifications structurales du complexe. Au contraire, le mécanisme de la sphère externe est déterminé par la diffusion des molécules d'eau autour du complexe et reste impossible à moduler.

La relaxivité de la sphère interne est déterminée par plusieurs paramètres microscopiques du complexe, les plus importants étant le nombre d'hydratation, la vitesse de l'échange d'eau entre la sphère de coordination et le solvant, le temps de corrélation rotationnelle du complexe, et les temps de relaxation du spin électronique du Gd(III) (équation I.12) :

$$r_1^{IS} = \frac{cq}{55.5} \frac{1}{T_{1m} + \tau_m} \quad \text{I.12}$$

Avec :

C : la concentration molaire,

q : le nombre de molécules d'eau directement coordonnées au centre métallique,

τ_m : le temps de vie d'une molécule d'eau dans la sphère interne du complexe (égal à l'inverse de la constante de vitesse d'échange, $1/k_{ex}$)

T_{1m} : le temps de relaxation des protons des molécules d'eau coordonnées. T_{1m} dépend du temps de corrélation rotationnel (τ_r), des temps de relaxation électroniques (T_{1e} et T_{2e}), ainsi que du champ.

La relaxivité est proportionnelle au nombre de molécule d'eau q directement liée à l'ion paramagnétique. Tous les agents de contraste commercialisés possèdent une molécule d'eau dans la première sphère. Il serait alors facile d'augmenter la relaxivité en utilisant des complexes qui contiennent plus d'une molécule d'eau d'hydratation. Cependant, plus le nombre de molécule d'eau est grand dans la sphère de coordination, plus la stabilité du complexe diminue. Or, l'objectif est d'avoir un complexe stable jusqu'à son élimination par le corps.

L'échange entre la/les molécules d'eau coordonnées au centre métallique avec les molécules d'eau du milieu aqueux est caractérisé par la vitesse d'échange d'eau $k_{ex} = 1/\tau_m$. La valeur de cette vitesse doit présenter le compromis entre un échange ni trop lent, sinon l'effet paramagnétique ne sera pas correctement transmis, ni trop rapide, pour que les molécules d'eau aient le temps nécessaire pour sentir l'effet du centre paramagnétique.

Le temps de corrélation rotationnelle est lié à la taille moléculaire de l'agent, ce qui le rend le paramètre le plus facile à moduler pour augmenter la relaxivité. Puisque les agents de contraste commerciaux ont des petites tailles, le temps de corrélation rotationnelle limite leur relaxivité⁶¹.

8. Agents d'imagerie pour la détection des plaques amyloïdes

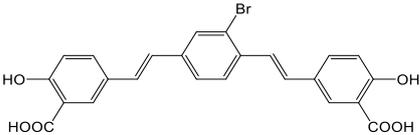
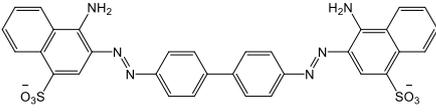
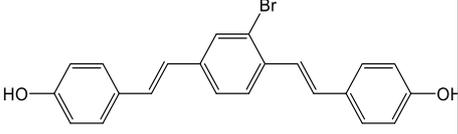
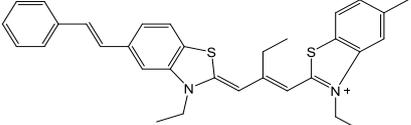
Depuis une dizaine d'années, de nombreuses molécules ont été développées pour la détection des plaques amyloïdes en différentes techniques d'imagerie. Parmi ces sondes d'imagerie, on trouve des molécules organiques de petite taille qui représentent la plupart des exemples, des complexes métalliques ainsi que des nanoparticules.

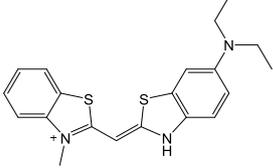
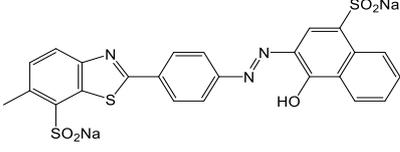
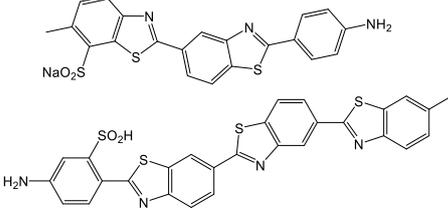
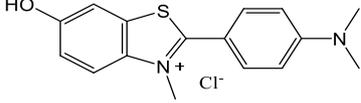
8.1 Petites molécules organiques

8.1.1 Petites molécules utilisées en fluorescence

De nombreuses petites molécules aromatiques sont connues depuis longtemps pour avoir une affinité vers les peptides amyloïdes. Grâce à leurs groupements chromophores, elles sont utilisées dans la détection optique des plaques amyloïdes. Quelques exemples caractéristiques sont listés dans le tableau I.7 :

Tableau I.7: Quelques exemples de petites molécules développées pour la détection des peptides amyloïdes dans différentes pathologies.

Molécules	Structure	Pathologie	Peptides
BSB ⁷⁸		Maladie d'Alzheimer	A β
Congo Red ⁷⁹		Maladies neurodégénératives	Amyloïdes
K114 ⁸⁰		Maladies : Parkinson Alzheimer	α -Synucléine A β ₁₋₄₀
SH-516 ^{81, 82}		Maladie de Parkinson	Amyloïde α -Synucléine

T-284 ⁸³		Maladie de Parkinson	α -Synucléine
Thiazin red ⁸⁴		Maladie d'Alzheimer	Tau, β -amyloïde
Thioflavin S ^{*85}		Maladie d'Alzheimer	Tau-A β
Thioflavin T ^{86, 87}		maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ), Encephalopathie Spongiforme Bovine (ESB), Huntington Parkinson	Insuline β -amyloïde

Ces études ont montré que les molécules de ThT se placent parallèlement aux fibres amyloïdes⁸⁸. De plus, des simulations suggèrent que le Congo Red a tendance à se fixer de façon parallèle et antiparallèle⁸⁹ sur 6 brins de fibres (Figure I.11), sachant que la distance entre les deux groupements d'acide sulfonique est de 19Å. Quant au ThT, étant une plus petite molécule, il interagit avec 3 ou 4 brins de fibres.

Le ThT et le Congo Red sont deux molécules de référence dans les études de formation des plaques amyloïdes; ils sont régulièrement utilisés dans les études de compétition dans l'évaluation des nouvelles générations de sondes d'imagerie. L'utilisation du ThT est très répandue dans les études sur les maladies neurodégénératives, mais également dans les pathologies vasculaires, cardiaques ainsi que le diabète de type II.

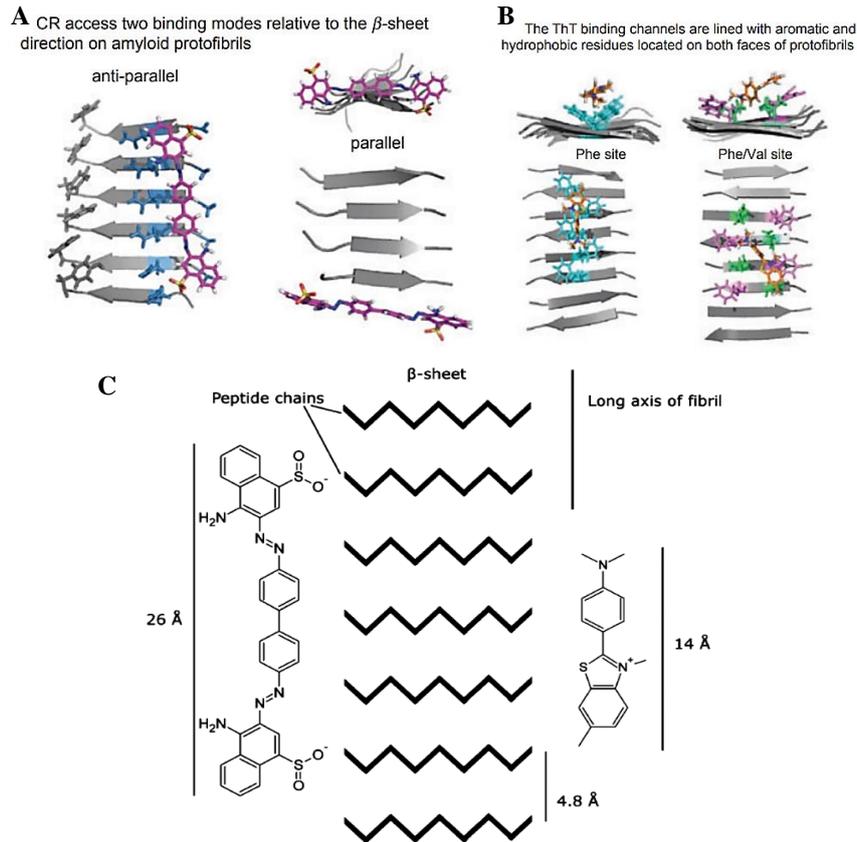


Figure I.11 : Simulation de l'interaction du Congo Red (A)⁸⁹ et du ThT (B)⁸⁹ aux feuilletts β des fibres amyloïdes suite à des résultats de diffraction de rayons X et aux différences de taille entre les molécules et les feuilletts β (C) (tiré de Groenning⁸⁸).

8.1.2 Petites molécules utilisées en imagerie TEP

La plupart des études concernent la détection de l'A β dans le contexte de la maladie d'Alzheimer. La première molécule développée ayant une très bonne affinité aux plaques amyloïdes ($K_D=10\text{nM}$) est le Pittsburgh Compound B (PiB). Il s'agit d'un analogue non-chargé et radiomarcqué de la Thioflavin T (Figure I.12) qui est un sel de benzothiazole. Le radioisotope ^{11}C du PiB, ayant un temps de demi-vie court (20 min) limite la possibilité des études cliniques⁹⁰.

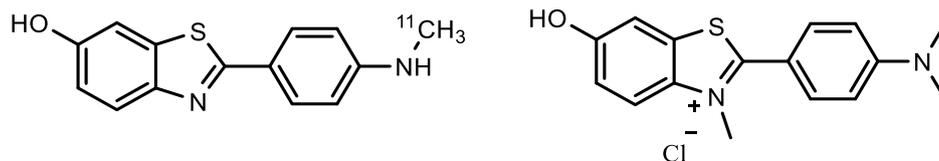


Figure I.12: Structure du Pittsburgh compound B (gauche) et Thioflavin T (droite).

Par la suite, divers dérivés du PiB et analogues ont été développés en utilisant le ^{18}F comme radionucléide (Figure I.13), comme le ^{18}F -florbetapir (AV-45) connu sous le nom d'Amyvid, le ^{18}F -flutemetamol (GE-067) connu sous le nom de Vizamyli, le ^{18}F -florbetaben (AV-1, BAY94-9172) connu sous le nom de NeuraCeq. Les études de ces molécules ont montré une très bonne affinité aux peptides amyloïdes ainsi qu'un passage au cerveau suffisant pour l'imagerie (Tableau I.8). Ces molécules ont été approuvées par L'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux pour la détection des plaques $\text{A}\beta$ dans le cas de la maladie d'Alzheimer (Figure I.13).

Il faut noter que le K_i représenté dans le tableau est obtenu suite à des études de compétition entre les molécules à tester et des molécules connues pour leur affinité au peptide en question. Le K_i peut être calculé une fois le IC_{50} et le K_D sont connus pour un substrat S, il est ensuite déterminé par les équations de Cheng and Prusoff⁹¹ en prenant en considération de K_D de la molécule de compétition.

$$K_i = \frac{\text{IC}_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_D}} \quad \text{I.13}$$

Plus le K_i est petit, plus l'affinité des molécules testées pour le peptide est élevée.

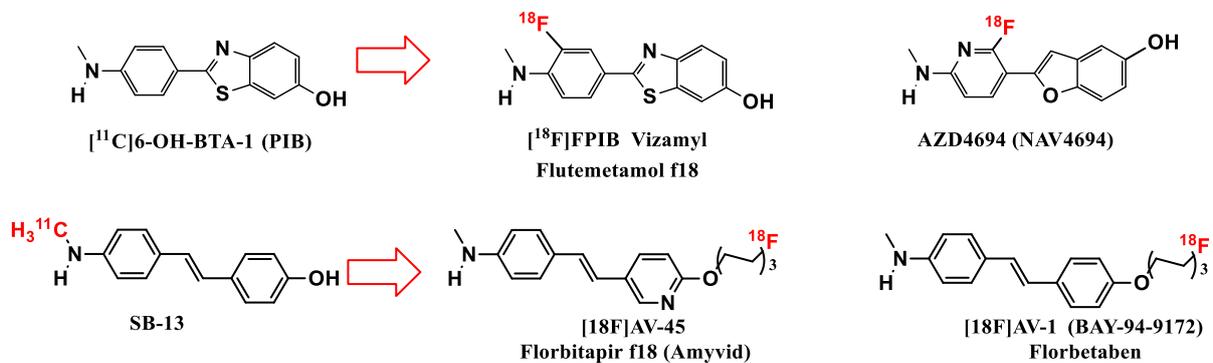


Figure I.13: Petites molécules fluorées pour la détection des peptides amyloïdes⁴⁶.

Tableau I.8: Constantes d'inhibition, K_i , constantes de dissociation K_D , coefficients de partage, log P, et données de biodistribution de quelques agents TEP ⁹²

Molécule	K_i $A\beta$ 1-40 (nM)	K_D $A\beta$ 1-40 (nM)	LogP $A\beta$ 1-40	Biodistribution dans le cerveau (%ID/g)
PiB	0.8	4.7	1.2	2min : 1.50 30min : 0.31
Flutemetamol(Vizamyl)	0.7	-	1.7 ⁹³	5min :3.67 30min :0.42
NAV4694 (AZD4694)	2.3	18.5	2.8	2min :1550 nM 30min :154nM (D'après des images suite à une autoradiography ⁹⁴)
SB-13	3.2	-	2.4	2min : 1.15 30min :0.42
Florbitapir(Amyvid)	2.9	-	-	2min :7.33 30min :1.66
Florbetaben (Neuraceq)	2.2	-	2.4	2min : 7.77 30min : 1.59

Rokka *et al.* ont travaillé sur un deuxième dérivé de curcumine et des études *in vivo* ont été menées sur des souris transgéniques APP23. Ces études montrent que ce composé est éliminé facilement au bout de 1 à 5 minutes et l'accumulation du complexe détecté ne dépasse pas 0.04 %ID/g chez la souris au niveau du cerveau⁹⁶. En 2014, Mourtas *et al.* ont synthétisé un dérivé de curcumine avec une chaîne de polyéthylène glycol et pour assurer son passage à travers la barrière hématoencéphalique (BHE), la molécule était fonctionnalisée par un anticorps anti-transferrine. Ainsi la fluorescence détectée était six fois plus intense dans le cerveau par rapport aux molécules non vectorisées⁹⁷.

Trembath *et al.* ont effectué des tests cliniques avec le Florbitapir, utilisant une injection intraveineuse d'une dose correspondante à 370Mbpq sur des patients MA. Dans le cas de vieillissement et de maladies neurodégénératives, une atrophie a été détectée au niveau du cortex cérébral diminuant l'épaisseur de la matière grise. Des facteurs techniques peuvent influencer la qualité des images et en conséquence l'interprétation de l'état de l'accumulation des fibres amyloïdes⁹⁸.

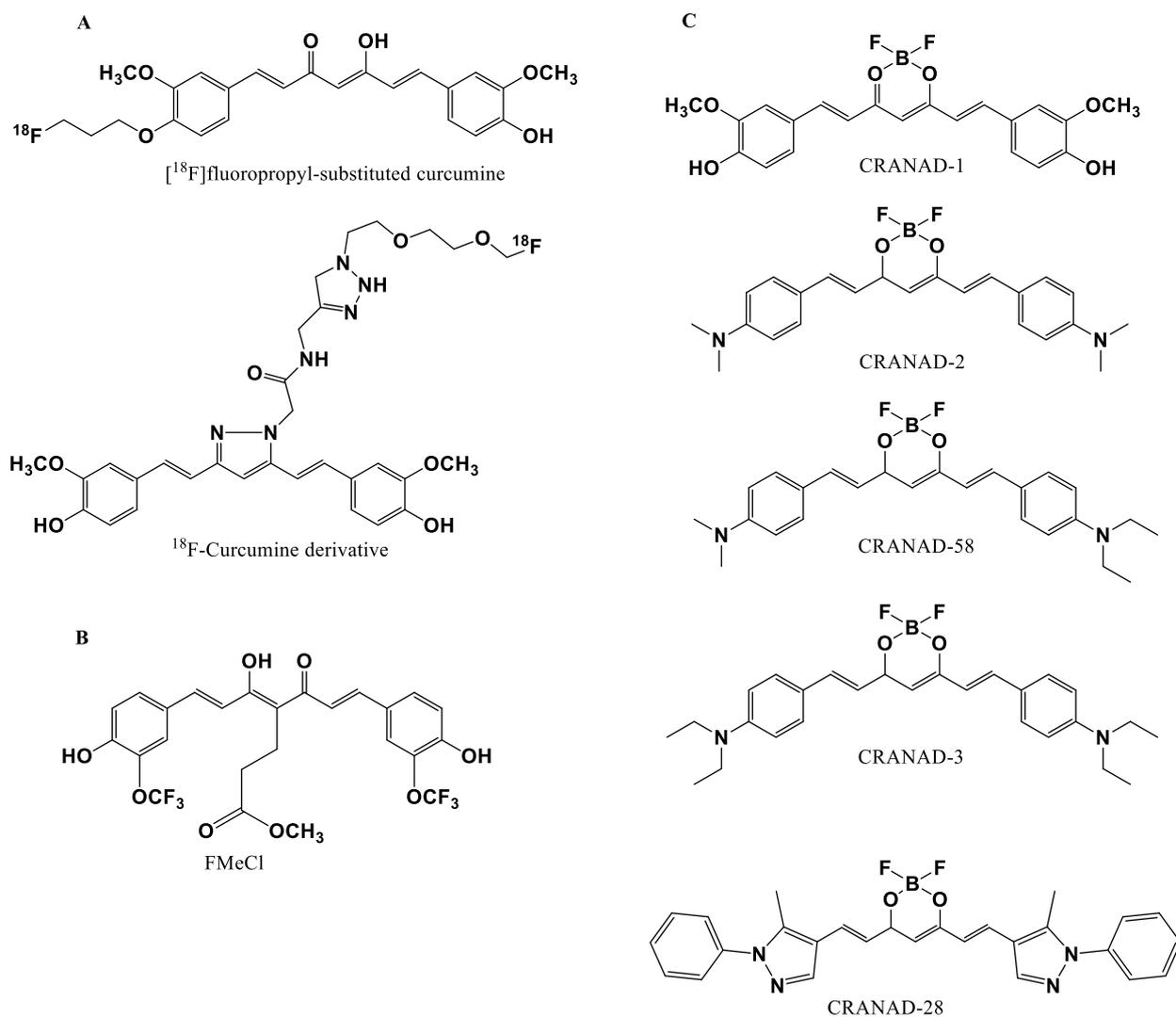


Figure I.14 : Dérivés de la curcumine pour imagerie TEP (A), IRM (B) ou optique (C)⁹⁹.

Des composés à base de curcumine sont utilisés dans des essais cliniques (Figure I.14). Bien que la curcumine soit tolérée par l'organisme, peu chère et ait une affinité au dépôt amyloïde, sa détection reste un défi. Ceci s'explique par sa faible solubilité dans l'eau, sa faible absorption puisque même pour une ingestion de 8g de curcumine, il reste indétectable dans le plasma⁹⁹.

Bien que plusieurs petites molécules aient été étudiées, le passage par la barrière hématoencéphalique (BHE), la solubilité, la sélectivité ainsi que l'affinité de ces agents d'imagerie reste à améliorer. Néanmoins, la sélectivité semble difficile à augmenter puisqu'elle est plutôt liée à la structure secondaire des fibres et pas à leur nature¹⁰⁴.

Tableau I.9: Constantes de dissociation de différents dérivés de curcumine caractérisant leur interaction avec des peptides amyloïdes

Composé	K _D	Réf
18F-dérivés de curcumine	Aβ40 et Aβ42 agrégats : K _i de 0.07 à 50nM	(Rokka <i>et al.</i> , 2014) ⁹⁶
CRANAD-28 (imagerie par microscopie bi-photonique)	Aβ40 monomers: K _D = 68.80 nM, Aβ42 monomers: K _D = 159.70 nM, Aβ42 dimers: K _D = 162.90 nM, Aβ42 oligomers: K _D = 85.70 nM, Aβ40 agrégats: K _D = 52.40 nM.	(Zhang <i>et al.</i> , 2014)
Analogue de curcumine FMeC1 (IRM)	Aβ agrégats : 75% d'interaction (UV-vis suite à un équilibre tautomérique de la molécule) ¹⁰⁰	(Yanagisawa <i>et al.</i> , 2011) ¹⁰¹
CRANAD-1, Analogues de curcumine (IR-Fluorescence)	K _D = 38.00 nM	(Ran <i>et al.</i> , 2009) ¹⁰²
CRANAD-58,	Aβ40: K _D = 105.80 nM, Aβ42: K _D = 45.80 nM	(Chen <i>et al.</i> , 2018) ¹⁰³
CRANAD-3,	Aβ40 monomers: K _D = 24.00 nM, Aβ42 monomers: K _D = 23.00 nM	(Ran <i>et al.</i> , 2009; Zhang <i>et al.</i> , 2013, 2015).

En ce qui concerne la détection de l'amyline au niveau du pancréas (Figure I.15) trois petites molécules présentent de très bonnes affinités. Le premier exemple porte sur le ¹⁸F-FPMP¹⁰⁵, une petite molécule radiomarquée au ¹⁸F. Deux minutes après l'injection dans des souris transgéniques, 6.00 %ID/g de ¹⁸F-FPMP se trouve au niveau du pancréas. La radioactivité s'associe au signal optique du ThS chez les souris transgéniques et aucune radioactivité n'est détectée au niveau du pancréas chez les souris saines.

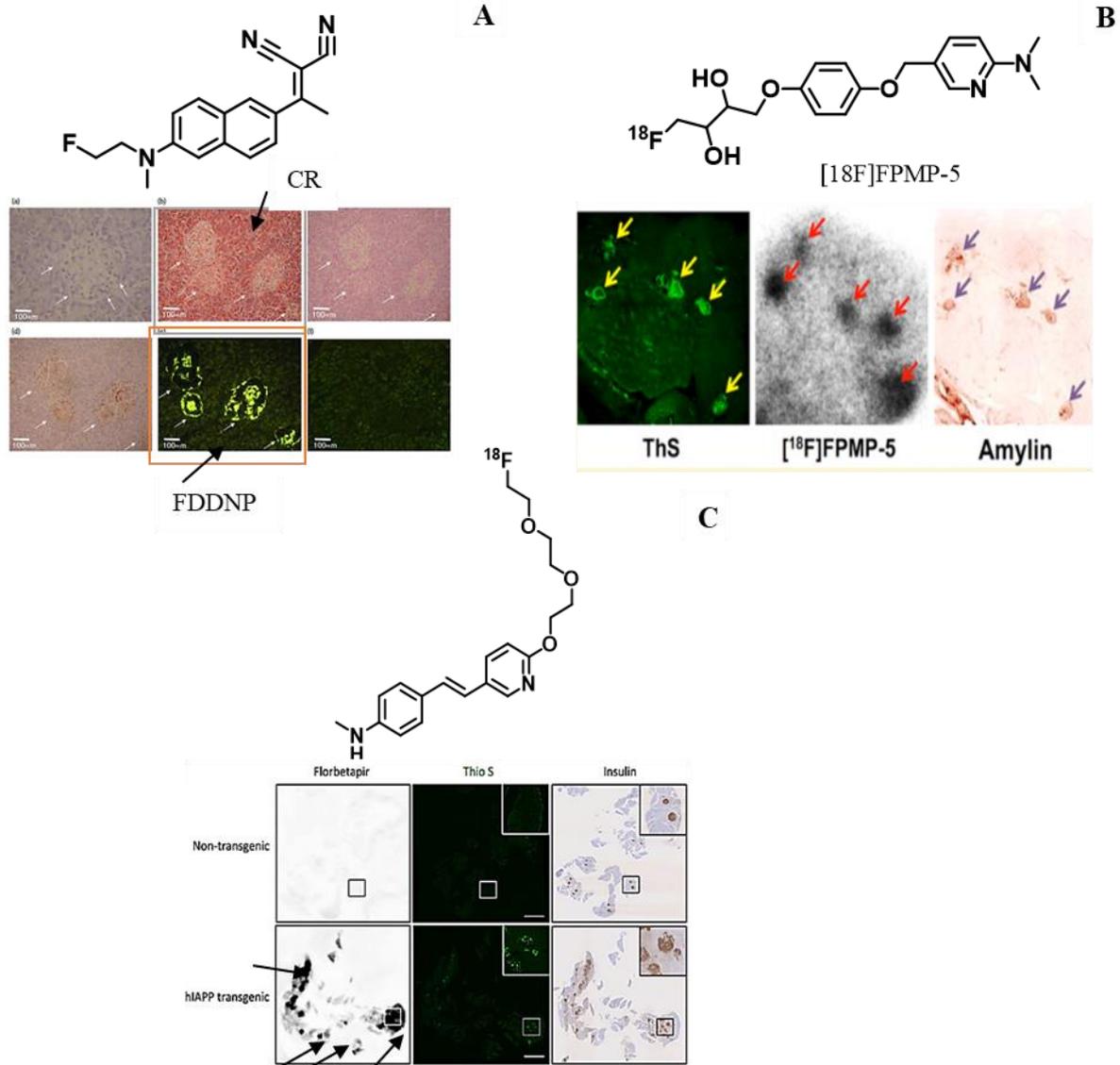


Figure I.15: Exemples de petites molécules : FDDNP (A) testé sur des sections de pancréas de patients diabétiques. Détection vérifiée par Congo Red (CR). [¹⁸F]FPMP (B) testé sur des souris transgéniques exprimant l'amyline humaine. Détection vérifiée par le ThS, ainsi que sur des sections de pancréas humaine saine. Florbetapir (C) testé sur des souris transgéniques exprimant l'amyline humaine et sur des souris contrôles. Détection vérifiée par ThS ^{105,106,107}.

Florbetapir¹⁰⁶ et le ¹⁸F-FDDNP¹⁰⁷ ont été testés sur des rats modèle Alzheimer et des souris transgéniques exprimant l'amyline humaine. Ensuite, FDDNP a été utilisé dans des essais sur des sections de pancréas humains atteints de diabète de type 2 et des essais cliniques sur des patients diabétiques sont en cours¹⁰⁷. Ces molécules montrent une bonne spécificité pour les plaques amyline *in vitro* et une pharmacocinétique prometteuse.

Plus récemment, Ono *et al.* ont développés et étudié le [¹⁸F]DANIR-F 2c, une petite molécule destinée particulièrement à la détection de l'amyline dans le pancréas. Différentes études ont été menées¹⁰⁸, *in vitro* sur des agrégats d'amyline et des tissus sains et malades (diabète Type II) de pancréas humain, des études *in vivo* sur des souris saines, ainsi que *ex vivo* sur des souris où des agrégats d'amyline humaine ont été transplantés dans le pancréas. Chez les souris transplantées, la radioactivité a été détectée au niveau de tout le pancréas ce qui suggère la non-spécificité aux agrégats amyloïdes transplantés. Pour les souris saines, une forte accumulation de la sonde a été observée au niveau de la rate, très proche du pancréas, ce qui rend difficile voire impossible une détection au niveau du pancréas.

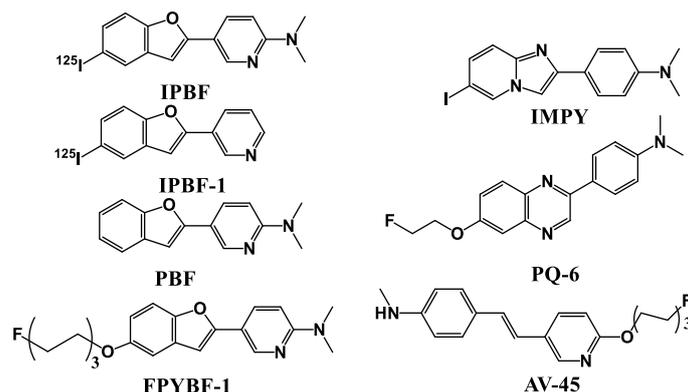
8.1.3 Petites molécules utilisées en imagerie TEMP

L'IPBF est une petite molécule développée pour la détection de l'amyline et c'est le seul exemple de petite molécule dans le cas de T2DM.

Yoshimora *et al.* ont testé l' [¹²⁵I]IPBF sur des sections de pancréas de patients atteints de T2DM en comparaison à des sections de pancréas sains (Tableau I.10). L'affinité de [¹²⁵I]IPBF à l'amyline est élevée et elle est ainsi traduite par un $K_i = 2.66 \pm 0.554$ nM. Les études *in vivo* ont montré une accumulation excessive au niveau du foie de 31.7 %ID/g à 2 min post-injection, due à la lipophilie du composé. A 60 min post-injection, une accumulation importante au niveau des intestins (50.05 %ID/g) rend la détection des plaques amyloïdes au niveau du pancréas très difficile¹⁰⁴. Des améliorations de structure sont nécessaires, mais ce que nous pouvons retenir de ce design est que le groupement aminodiméthyle est important pour l'affinité à l'amyline¹⁰⁴.

Tableau I.10: Comparaison des constantes d'affinités des dérivés de pyridylbenzofurane à l'amyline.

Composé	K_i (nM)
IPBF	2.66 ± 0.554
FPYBF-1	12.5 ± 1.67
IMPY	71.8 ± 10.1
PQ-6	61.4 ± 8.75
AV-45	501 ± 40.8
PBF	73.9 ± 5.68
IPBF-1	609 ± 94.9



Complexes métalliques pour la détection de plaques amyloïdes

8.2 Agents de contraste IRM

8.2.1 Exemple de Poduslo¹⁰⁹

Le premier agent d'imagerie qui cible l'A β a été reporté par Poduslo *et al.* Des séquences de peptide A β_{40} et A β_{42} ont été modifiés par un groupement polyamine putrescine, et ensuite couplées à des complexes de type Gd(DTPA). Ces agents de contraste ont été testés sur des souris transgéniques AD. Toutefois, l'injection du mannitol était nécessaire pour améliorer le passage des complexes par la BHE et les acquisitions IRM ont duré plus que 14h à haut champs (7 T)¹¹⁰.

8.2.2 Exemple de Bort *et al.*¹¹¹

Une série de complexes de Gd(III) a été développée dans le cadre de la maladie d'Alzheimer (Figure I.16). Différents macrocycles, espaceurs et unités de reconnaissance ont été testés, à savoir les macrocycles de type DOTA et PCTA (PCTA = 3,6,9,15-tetraaza bicyclo[9.3.1]-pentadeca-1(15),11,13-triene-3,6,9-triacetic acid), des dérivés de PiB, IBOX et SB-13 comme unité ciblant le peptide amyloïde, et des espaceurs neutres, anioniques (mono, di et tri anioniques) et cationiques (mono, di et tri cationiques), totalisant ainsi 52 molécules à tester.

Les résultats ont montré que les agents de contraste à base de Gd-DOTA ont une bonne solubilité (>2.5-5mM). Il est aussi important que l'unité ciblant soit assez disponible grâce au linker de nature chaîne peptidique pour une meilleure interaction avec les agrégats amyloïdes. Par contre, les agents de contraste à base de Gd-PCTA ont révélé une faible solubilité (<1-2mM) en soulignant l'importance de l'ajout d'un espaceur chargé. Cependant, la charge négative au niveau des espaceurs gêne l'interaction entre les complexes et les plaques amyloïdes.

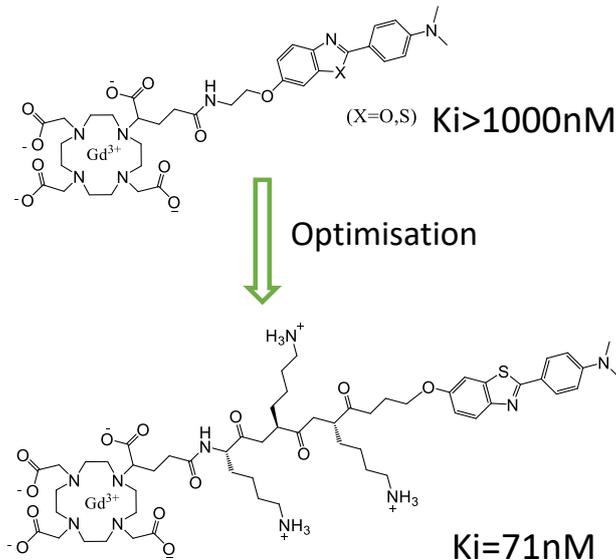


Figure I.16: Exemple de deux complexes de Gd(III) et comparaison des constantes d'affinité après plusieurs modifications de structure.

Les auteurs ont pu conclure que la longueur et la nature de l'espaceur ainsi que la charge du complexe jouent un rôle important dans l'interaction des complexes avec les agrégats amyloïdes. Un linker plus long permet une meilleure disponibilité de l'unité ciblant pour reconnaître les plaques amyloïdes. Malheureusement aucune de ces molécules n'avaient les caractéristiques nécessaires pour être qualifiée d'une bonne sonde IRM à tester en clinique.

8.2.3 Exemple de Vithanarachchi *et al.*¹¹²

La curcumine est l'unité ciblant qui a été couplée à un complexe de GdDTPA pour développer un agent de contraste IRM. Grâce à sa taille plus grande, le complexe (Figure I.17) étudié a une meilleure relaxivité, $r_1 = 13.63 \pm 0.03 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (dans du PBS, pH 7.4, 1.4T à 37°C), que le Gd(DTPA) avec $r_1 = 3.30 \pm 0.06 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

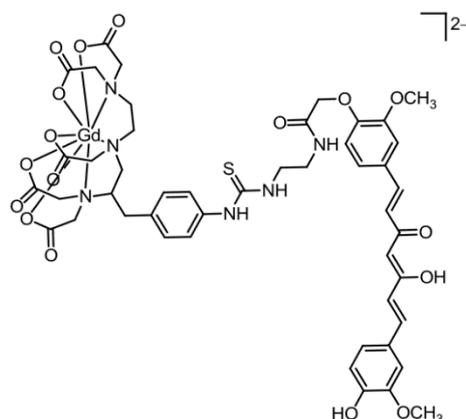


Figure I.17: Agent de contraste à base de Gd(III) couplé à une molécule de curcumine.

Suite à une interaction du complexe avec des plaques A β , la valeur du T₁ diminue. En parallèle, l'intensité de la fluorescence de la curcumine diminue également, accompagné d'un changement de longueur d'onde d'émission.

8.2.4 Exemple de Martins *et al.*

Dans notre équipe, des agents d'imagerie multimodaux destinés à la fois à l'IRM et aux techniques nucléaires ont été développés. Ils sont destinés à la détection des plaques amyloïdes dans le cerveau dans le cadre de la maladie d'Alzheimer. De différents espaceurs ont été utilisés afin de moduler la perméabilité à travers la BHE et influencer l'affinité en tenant compte de la disponibilité de l'unité ciblante (Figure I.18) :

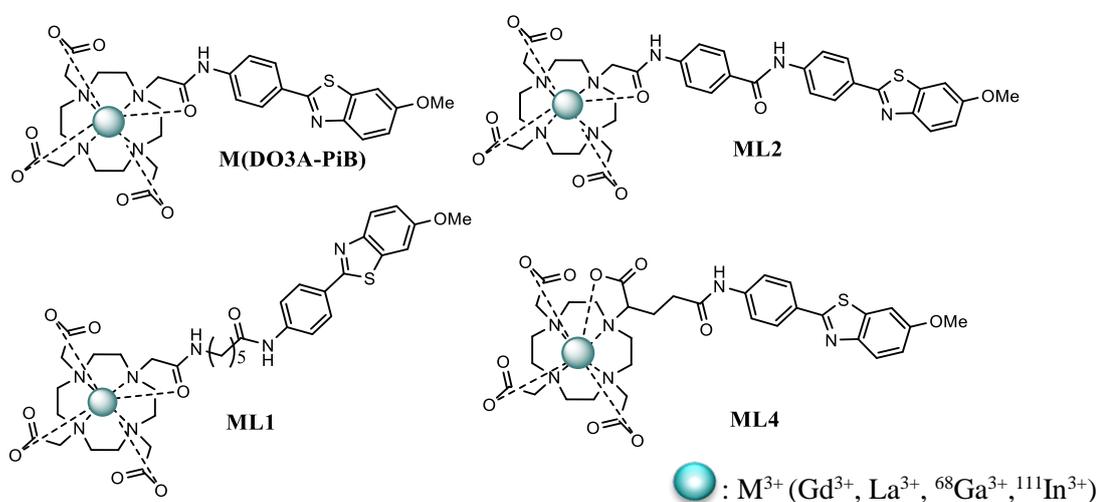


Figure I.18: : Les complexes neutres M(DO3A-PiB), ML1 et ML2 et le complexe ML4 chargé (-), développés par l'équipe^{54,55,113-115}.

Les différents ligands forment des complexes neutres (M(DO3A-PiB), ML1, ML2) ou chargé négativement (ML4) avec le Gd(III) (IRM), l'¹¹¹In(III) (TEMP) et le ⁶⁸Ga(III) (TEP).

Des études d'affinité ont été faites avec les complexes LaL1 et La(DO3A-PiB) en utilisant la technique de la STD (différence de transfert de saturation par RMN) et la SPR (Surface Plasmon Resonance) sur des agrégats du peptide A β ₁₋₄₀ (Tableau I.11).

Tableau I.11: Constantes d'affinité des complexes par deux techniques SPR et RMN(STD)¹¹⁴

Complexe	K _D (SPR) μ M	K _D (STD) μ M
La(DO3A-PiB)	170	160
LaL1	67	80
GdL4	194 ¹¹⁵	-

Dans le même contexte, des études d'interaction ont été menées également par RMN de ^1H - ^{15}N HSQC et ^1H - ^{13}C HSQC⁷⁷ entre les formes monomériques du peptide $\text{A}\beta_{1-40}$ et les 4 complexes. Ces études RMN (HSQC) ont révélé une faible interaction du complexe chargé GdL4 avec le peptide amyloïde *versus* une interaction négligeable des complexes neutres avec le peptide monomérique.

Les résultats obtenus sont prometteurs mais les structures doivent être améliorées davantage pour augmenter le passage par la BHE.

8.2.5 Exemple de Marquette *et al.*

Des nanoparticules (NP) contenant des complexes de Gd(III) ainsi que des unités de reconnaissance ont été également développées. Par exemple, des nanoparticules AGUIX, constituées d'un réseau de polysiloxane et portant des chélateurs DOTAGA pour complexer le Gd(III), ont été fonctionnalisées par des dérivés de PiB attachés via des espaceurs de type polyethylene glycol (PEG)¹¹⁶. Des ligands libres sont aussi présents sur la surface de nanoparticules pour complexer des radio-isotopes (Ex : ^{68}Ga (III) ou ^{111}In (III)). Ces NPs ont été testés avec des agrégats d' $\text{A}\beta$ et d'amyline et sur des sections de cerveaux de modèle de souris MA et de pancréas de souris transgéniques exprimant l'amyline humaine. La reconnaissance des dépôts d'amyloïdes a été confirmée par la fluorescence du dérivé du PiB.

8.2.6 Exemple de nanotubes de carbone *f*-MWNTs fonctionnalisés

Il a été reporté que les nanotubes de carbones ont la capacité de passer les barrières biologiques ainsi que la BHE¹¹⁷. Des dérivés de nanotubes de carbones ont été couplés à des ligands ayant une unité macrocyclique pour la complexation de ^{111}In (III) pour imager en TEMP et une unité de dérivé de PiB pour une interaction avec les plaques amyloïdes au niveau du cerveau.

Des images TEMP ont été obtenues sur le modèle de souris C57BL/6, à 30min, 4h et 24h après injection. Le passage par la BHE est déterminé par le ratio entre le parenchyme cérébral et le sang P/B. Dans ce cas, le ratio P/B le plus élevé est obtenu avec $^{111}\text{In}(\text{L1})\text{:ox-MWNTs-NH}^{3+}$ (~0.074) comparé à $^{111}\text{In}(\text{L2})\text{:ox-MWNTs-NH}^{3+}$ (~0.04, $p < 0.01$). Globalement, $^{111}\text{In}(\text{L1})\text{:ox-MWNTs-NH}^{3+}$ a une amélioration du passage au cerveau avec une accumulation ~dix fois plus élevée que celle des complexes seuls sans les *f*-MWNTs ; cette valeur est égale à (~1.16 % ID/g). Par contre, avec $^{111}\text{InL2}$, l'accumulation au niveau du cerveau est de $(0.22 \pm 0.03 \text{ \% ID/g})$ présentant une amélioration non significative de passage au cerveau¹¹⁷.

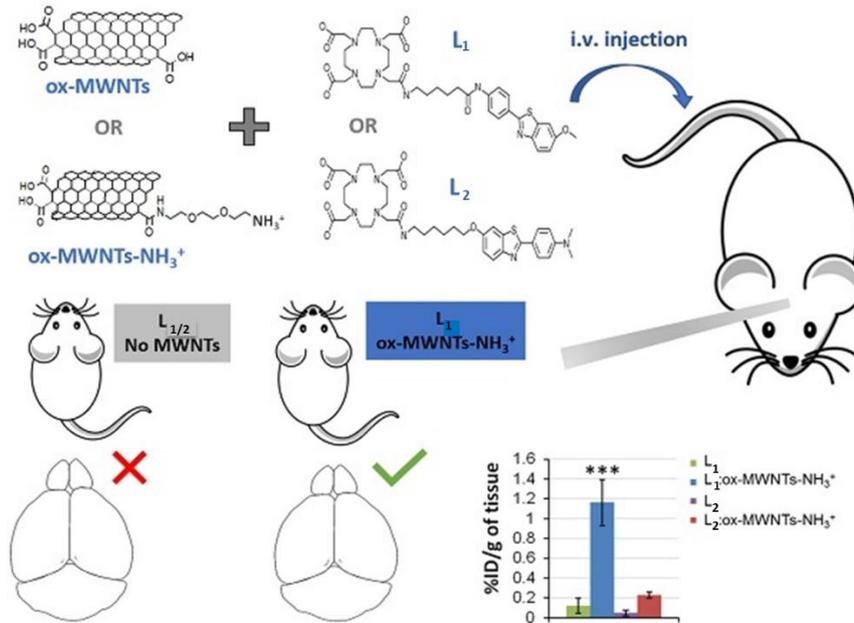


Figure I.19: Fonctionnalisation des nanotubes de carbones par des complexes de Gadolinium des dérivés de PiB pour une meilleure vectorisation au cerveau pour la détection de peptide amyloïde¹¹⁷.

8.3 TEMP : complexes métalliques pour la détection des plaques amyloïdes

L'isotope le plus répandu pour les applications TEMP est le ^{99m}Tc. Le premier exemple a été reporté par Ono *et al.*¹¹⁸.

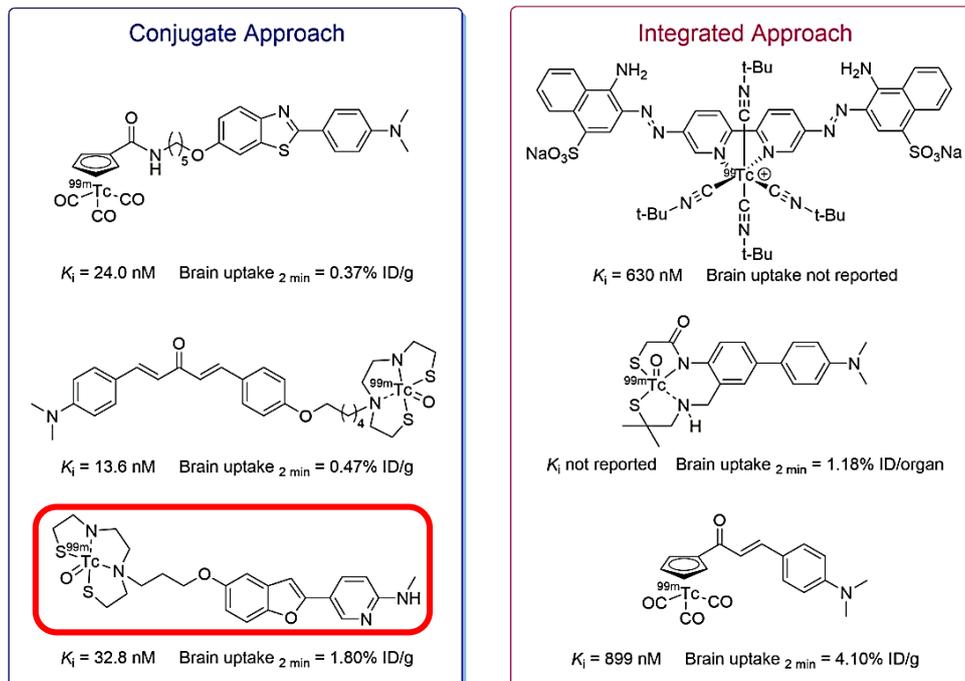


Figure I.20: Différentes structures de complexes de ^{99m}Tc¹¹⁸.

Chapitre I : Introduction

Il s'agit d'un dérivé de pyridyle benzofurane couplé à un bis-amino-éthane thiole pour complexer le ^{99m}Tc (^{99m}Tc -BAT-Bp-2, Figure I.20). Les études de biodistribution ont montré que le complexe est retrouvé dans le cerveau à 1.8%ID/g à 2 min après l'injection. Malgré ces résultats prometteurs, il n'y a pas eu d'études plus approfondies avec cette molécule.

Le deuxième exemple est reporté par Zhang *et al.*¹¹⁸. Des dérivés de 2-arylbenzothiazole ont été couplés à un complexe de technétium par des espaceurs de 4 à 6 chaînons.

Un des complexes a prouvé son efficacité suite à des études *in vivo* avec une importante accumulation au niveau du cerveau (2.11%ID/g à 2 minutes après injection chez la souris normal)¹¹⁸. Ce complexe a été étudié sur deux singes rhésus : un mâle de 4 ans et une femelle de 27ans. 1.01% de dose injectée s'accumule au niveau du cerveau au bout de 30min *versus* 1.23%ID au bout des dix premières minutes chez le singe male, et 0.67% de dose injectés s'accumule au niveau du cerveau au bout de 30min *versus* 0.78 %ID au bout de dix minutes dans le cas de la femelle (Figure I.21). Par conséquent, les résultats sur ce complexe sont prometteurs et confirment la preuve de concept de la sonde de ^{99m}Tc .

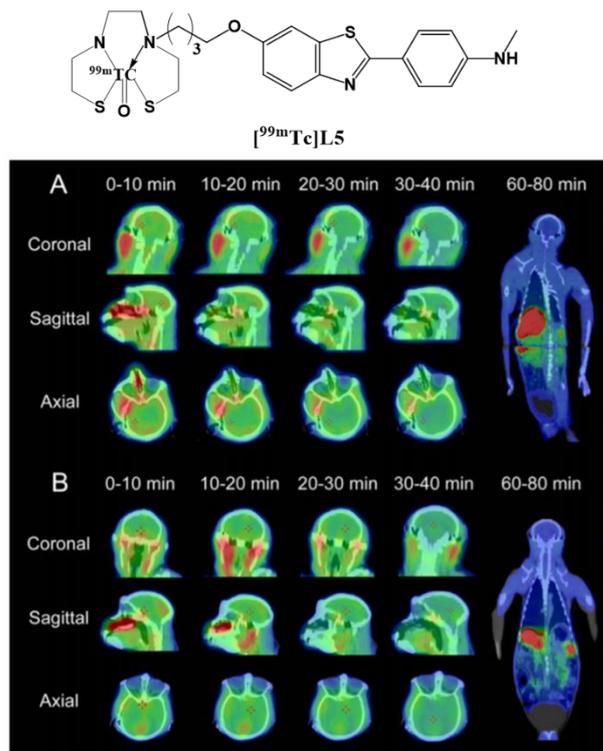


Figure I.21: Structure du complexe de Technétium et les images TEMP sur des singes Rhésus (adaptée de Zhang *et al.*)¹¹⁸.

Chapitre I : Introduction

Dans un troisième exemple, le 2-arylbenzothiazole a été substitué par le 3-styrylpyridine et le linker à 3 chainons par un oligoethylenoxy dans le but de réduire la lipophilicité de la molécule et améliorer la pharmacocinétique au niveau du cerveau.

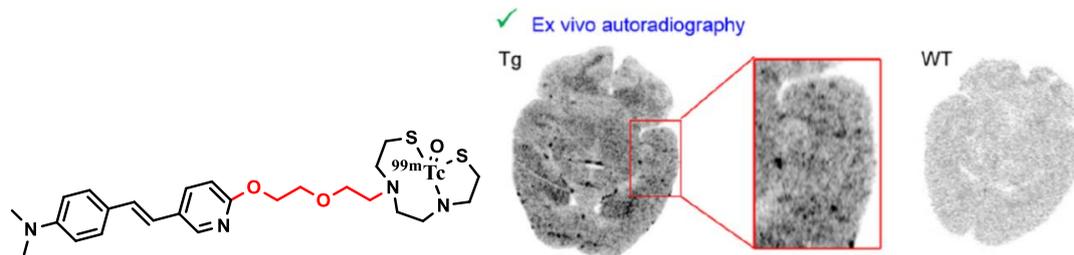


Figure I.22 : Complexe de ^{99m}Tc (à gauche) et (à droite) les résultats de l'autoradiographie *ex vivo* sur des souris transgénique (Tg) et des souris contrôle (WT : wild type)¹¹⁹.

Ces changements structuraux ont permis d'améliorer l'affinité, $K_i=13.4\text{nM}$ à l' $\text{A}\beta_{1-42}$. Une accumulation significative au niveau du cerveau chez les souris ICR (2.10%ID/g) et chez les singes Rhésus (3 males et 3 femelles) allant de 1.94 à 2.63% ID/g a été détectée au bout de 20min après injection.

Pour la détection des plaques amyline, Yoshimora *et al.* (Figure I.22) ont testé des complexes de technétium.

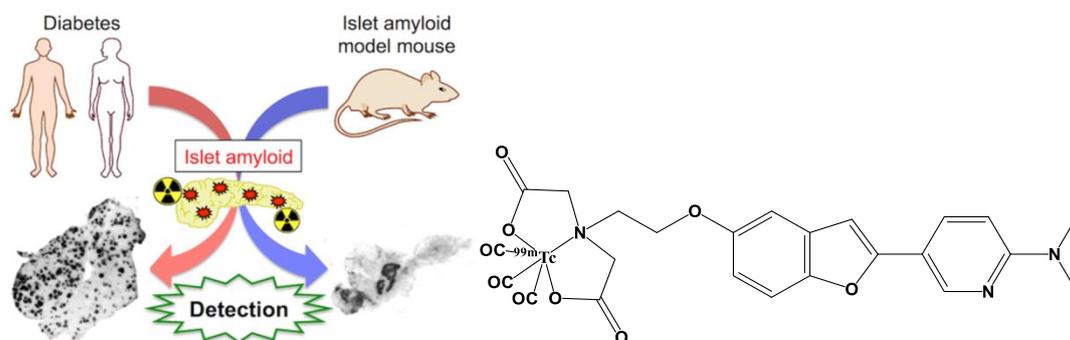


Figure I.23: Exemple de complexe de ^{99m}Tc pour la détection de l'amyline humaine injectée dans le pancréas de souris⁸.

De l'amyline humaine a été injectée dans le pancréas des souris et des études de fluorescence avec le ThS ont été faites pour s'assurer de la rétention des plaques injectés.

Une accumulation de radioactivité équivalente à 0.74 %ID/g à 2 minutes après l'injection a été mesurée chez les souris saines au niveau du pancréas. Par contre, une accumulation importante est enregistrée au niveau du foie. Cette accumulation est problématique et serait à éviter pour la détection de l'amyline dans le pancréas, car les deux organes sont très proches.

Une heure après l'injection du complexe de ^{99m}Tc dans le modèle (avec l'amyline précédemment injectée) et dans la souris saine, les valeurs de biodistribution mesurées au niveau du pancréas sont respectivement 0.470 %ID/g et 0.296 %ID/g. Cette expérience constitue la première preuve de concept de la détection des plaques amyline par un complexe de technétium.

Le dernier exemple concerne le complexe $^{111}\text{InL1}$ développé dans l'équipe (Figure I.18). $^{111}\text{InL1}$ a été testé sur des souris contrôles et une accumulation de 0.36 %ID/g au niveau du cortex et 0.5 %ID/g au niveau du cervelet a été obtenue 2 minutes après injection contre des valeurs de 0.11 et 0.21 %ID/g, respectivement, après 30 minutes d'injection. Ceci révèle un faible passage de ce complexe à travers la BHE, mais des optimisations de taille et de lipophilie du complexe doivent être réalisées pour améliorer le passage au cerveau⁵⁴.

8.4 Complexes métalliques pour la détection TEP des peptides amyloïdes

Comme dans le cas des agents IRM ou TEMP, les radiocomplexes développés pour le TEP se basent sur les petites molécules précédemment décrites qui reconnaissent les plaques, en rajoutant un chélatant pour la complexation des métaux. Ces derniers permettent l'exploitation des isotopes métalliques ayant une durée de demi-vie plus importante que le ^{11}C ou le ^{18}F . Malgré son temps de demi-vie limité, le ^{68}Ga semble intéressant pour la TEP grâce à la disponibilité du générateur du ^{68}Ga , permettant une production moins coûteuse et sans la proximité nécessaire d'un cyclotron, contrairement aux isotopes ^{11}C ou ^{18}F .

Dans l'équipe, les mêmes ligands à base de DOTA et de dérivé de PIB, précédemment étudiés pour la complexation du Gd(III)^{54,113,115}, ont été utilisés pour obtenir des complexes de ^{68}Ga destinés à la détection des plaques amyloïdes dans le cas de la MA (Figure I.18).

Les complexes $^{68}\text{GaL1-2}$ et $^{68}\text{GaL}(\text{DO3A-PiB})$ ont été impliqués dans une étude de biodistribution sur des souris transgéniques femelles APP/PS1 et des souris femelles contrôles C57Bl6. Des images $\mu\text{PET}/\text{CT}$ ont révélé une accumulation similaire dans le cerveau dans les souris APP/PS1 ou contrôles pour $^{68}\text{GaL1}$ et $^{68}\text{GaL2}$ (0.9-1.1 %ID/cc à 2 minutes après injection). Par contre, $^{68}\text{GaL}(\text{DO3A-PiB})$ s'est accumulé plus dans le cerveau des souris transgéniques que des souris contrôles (~1.3 %ID/cc vs. 0.5 %ID/cc ; 2 min après injection). Néanmoins, l'autoradiographie sur des sections de cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, incubées dans une solution du complexe $^{68}\text{GaL}(\text{DO3A-PiB})$ ensuite lavées, ne

déteçtait pas de dépôts amyloïdes. Nous pouvons associer ceci à la faible concentration testée ($>1.0 \mu\text{M}$)⁵⁵.

Dans une stratégie fondamentalement différente, un complexe d' $\text{Al}^{18\text{F}}\text{-NODA}^{47}$ a été utilisé pour complexer le fluorure $^{18}\text{F}^-$ et ainsi créer une sonde TEP. Song *et al.* ont ainsi synthétisé quatre sondes couplées à un dérivé du 2-phényle-benzothiazole *via* des linkers de 3 et 5 chaînons. Le macrocycle NODA a été choisi car il forme un complexe très stable avec l' Al(III) , capable de lier l'anion $^{18}\text{F}^-$ dans un complexe ternaire. Les constantes d'affinité K_i de ces molécules pour l' $\text{A}\beta_{1-40}$ varient de 11.3 à 124.1 nM, le K_i le moins élevé étant mesuré pour le complexe avec la plus longue chaîne alkyle et le groupement N-diméthyle.

Des études de biodistribution ont été menées sur des souris saines (accumulation au niveau du cerveau de $0.3\pm 0.04 \text{ \%ID/g}$, et $4.96\pm 0.38 \text{ \%ID/g}$ dans le pancréas). Le passage limité dans le cerveau a été attribué au faible $\log P$ (0.74), inférieur à la valeur optimale pour passer par la BHE. De plus, ces molécules ont été métabolisées par le foie et excrétées par les intestins. L'autoradiographie d'une section de cerveau de patient atteint de la MA comparée à une section contrôle, toutes les deux traitées par cette molécule (Figure I.23), montre un bon marquage des vaisseaux où s'accumulent les plaques $\text{A}\beta$ dans le cas d'une angiopathie cérébrale.

Un marquage fluorescent des plaques par un colorant spécifique (DANIR-3b fait partie de la famille de sondes NIR : émission maximale supérieur à 670 nm lors d'interaction avec les plaques $\text{A}\beta$ avec une affinité traduite par une constante de dissociation ($K_D = 14.5 \text{ nM}^{120}$)) a permis de confirmer une co-localisation du colorant et du complexe d' Al dans la tranche de cerveau malade, alors que le contrôle (tranche de cerveau de l'individu sain) ne montre aucune rétention du complexe.

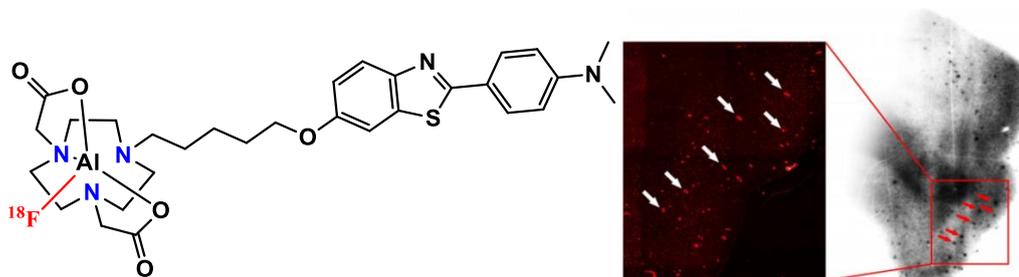


Figure I.24: $\text{Al}^{18\text{F}}\text{-NODA}$ développé par Song *et al.* pour la détection des plaques amyloïdes dans le cerveau⁴⁷.

9. Conclusion

Un grand nombre de pathologies impliquent l'accumulation des peptides amyloïdes dans divers tissus, la maladie d'Alzheimer, caractérisée par les plaques d'A β dans le cerveau, étant la plus connue et la plus étudiée. Le diabète est une autre maladie qui implique la destruction des cellules béta du pancréas avec l'apparition parallèle de dépôts d'un autre peptide amyloïde, l'amyline. De plus, ces différentes maladies semblent avoir un lien entre elles, via l'intervention des peptides amyloïdes.

Les étapes de l'agrégation des peptides ont été identifiées et un rôle important des cations métalliques (Zn(II), Cu(II)...) a été établi. Différentes approches thérapeutiques ont été proposées, en particulier dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, dont l'objectif était d'inhiber l'assemblage des peptides ou de favoriser l'élimination des dépôts.

D'importants efforts de recherche portent sur la détection *in vitro* ou *in vivo* des peptides amyloïdes, dans un but de mieux comprendre, mais aussi de mieux diagnostiquer les différentes pathologies et en particulier la maladie d'Alzheimer. Dans le contexte de la MA et parmi les techniques d'imagerie *in vivo*, les modalités d'imagerie nucléaire, comme la TEMP et la TEP, sont en général considérées comme les plus prometteuses. En effet, les sondes d'imagerie utilisées sont le plus souvent de petites molécules radiomarquées avec une bonne affinité vers les plaques A β , et grâce à leur taille et lipophilie, elles possèdent surtout une bonne capacité de passage à travers la BHE. En revanche, les sondes d'imagerie basées sur les complexes métalliques, et surtout les complexes de Gd(III) conjugués à une unité de reconnaissance du peptide développés comme agents de contraste IRM, sont de taille plus grande et plus hydrophiles. Ceci limite fortement leur passage de la BHE, donc leur potentiel pour la détection de la maladie d'Alzheimer. De plus, la plupart de ces complexes ont montré une affinité limitée vers les peptides amyloïdes.

10. Objectifs de la thèse

Bien que la présence des dépôts d'amyline dans le pancréas lié au diabète soit connue depuis un certain temps, très peu d'études ont visé la détection de l'amyline par l'imagerie *in vivo*. Alors que le passage limité de la BHE des sondes représente souvent la contrainte majeure pour la détection des plaques amyloïdes dans le cerveau, cette contrainte est levée pour une détection dans le pancréas.

Dans le cadre de cette thèse, nous allons nous focaliser sur la détection de l'amyline dans le cas du diabète de type II. Une telle détection *in vivo* pourrait contribuer à suivre les phénomènes moléculaires aboutissant à cette maladie, ainsi permettant avant tout une meilleure compréhension de la pathologie. La technique d'imagerie de choix est l'IRM, particulièrement intéressante pour les études sur petit animal grâce à sa haute résolution, bien meilleur que celle des modalités nucléaires. Il est important à mentionner qu'il n'existe aujourd'hui aucun agent de contraste IRM pour la détection des plaques d'amyline.

En ce qui concerne le design moléculaire des nouveaux agents de contraste, nous allons continuer à utiliser une approche modulaire, composée de 3 unités (Figure I.24). La première partie est un chélatant macrocyclique de type DOTA qui est capable de former des complexes stables et inertes avec différents métaux intéressants pour l'IRM (Gd(III)), mais également pour d'autres techniques d'imagerie (TEMP avec l' $^{111}\text{In}^{3+}$ par exemple). La deuxième partie est un espaceur ayant un effet sur la lipophilie et la taille de la molécule, ainsi que sur l'accessibilité de l'unité de reconnaissance à l'interaction avec les peptides. Cette troisième partie de la molécule, l'unité ciblante, doit avoir une bonne affinité à la cible biologique, l'amyline. Les dérivés de la molécule classique, le PiB seront utilisés.

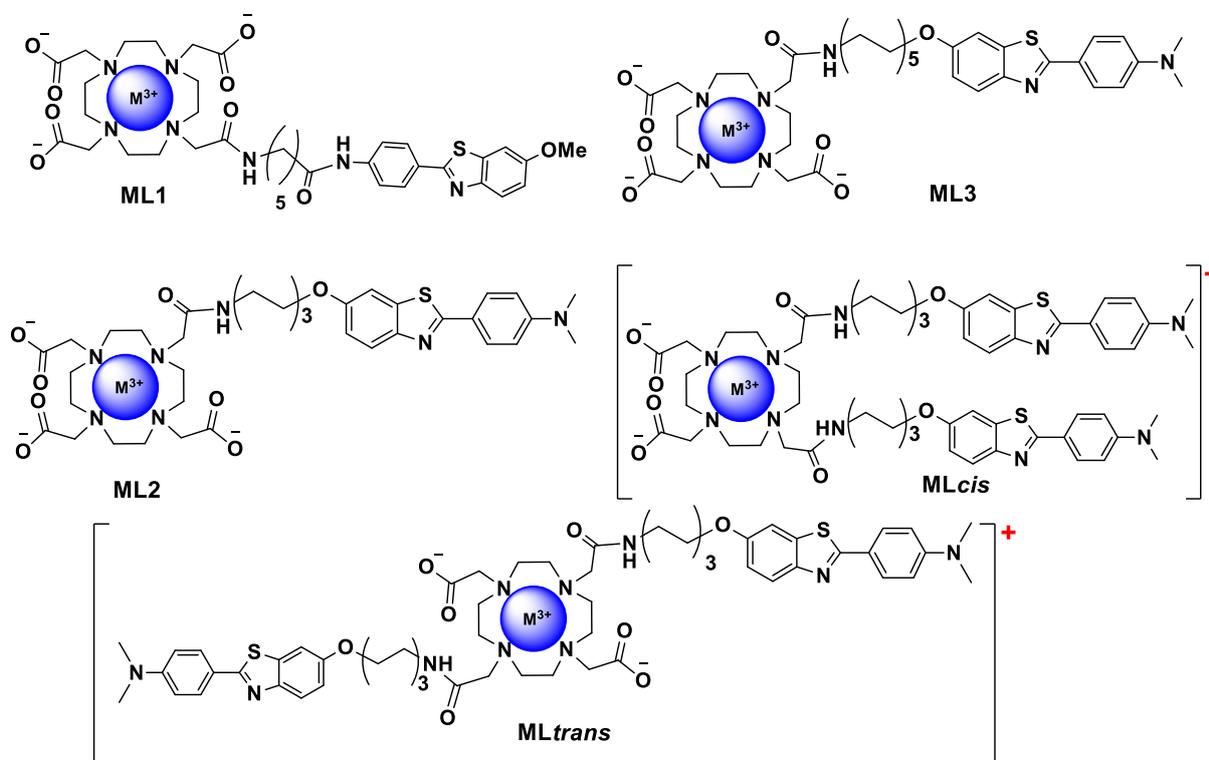


Figure I.25: L'ensemble des complexes MLx étudiés dans cette thèse.

L'objectif de la thèse est de synthétiser et de caractériser de nouvelles sondes multimodales pour l'IRM et la TEMP capables de détecter les dépôts des plaques amyloïdes au niveau du pancréas dans des modèles de petit animal. L'augmentation de l'affinité pour les peptides amyloïdes est un défi majeur. Dans cet objectif, deux approches différentes seront suivies. La première consiste à utiliser des espaceurs plus longs que dans les molécules précédemment étudiées dans l'équipe, afin de distancer le plus possible le complexe et l'unité de reconnaissance. Dans la deuxième approche, nous accrocherons deux unités de ciblage sur un macrocycle. Si possible, une sélectivité pour l'amyline par rapport aux autres peptides amyloïdes serait très intéressante à obtenir.

Les complexes ainsi obtenus seront étudiés par une panoplie de techniques physico-chimiques afin de déterminer leur affinité aux peptides amyloïdes et de mieux comprendre leur influence sur les phénomènes d'agrégation des peptides A β et amyline. La validation *in vivo* permettra, sur un plus long terme, de répondre à un besoin des biologistes pour mieux comprendre le diabète au niveau moléculaire.

Les résultats de ce projet vont être présentés comme suit :

Le Chapitre II portera sur les agents de contraste possédant une seule unité ciblante. Ce chapitre exposera la synthèse et la caractérisation physico chimique de deux nouvelles sondes. En particulier, l'état d'agrégation des complexes de Gd(III), caractérisé par différentes techniques (relaxométrie, UV-Vis, fluorescence), sera discuté.

Le Chapitre III décrira les études sur l'affinité de ces nouvelles molécules vis-à-vis des peptides amyloïdes et la comparaison aux résultats publiés précédemment pour d'autres complexes métalliques. Une étude de l'agrégation des peptides A β ₁₋₄₀ et amyline en présence de ces complexes métalliques sera également présentée. Enfin, le radiomarquage des ligands à l'¹¹¹In(III) et une étude de biodistribution sur souris saines seront décrits.

Le Chapitre IV décrira la synthèse de deux agents de contraste d'une nouvelle génération ayant deux unités ciblantes. Les parties PiB sont séparées du macrocycle par des chaînes alkyles de 6 carbones, introduites respectivement en position 1,7 (*trans*) ou 1,4 (*cis*) sur les azotes du macrocycle cyclène. Les complexes de ces deux nouveaux ligands ont été également objet d'une étude physico-chimique visant à déterminer leur affinité aux peptides et à suivre leur influence sur l'agrégation. Le Chapitre V exposera la partie expérimentale.

11. Bibliographie

- (1) Le diabète, enjeu sanitaire planétaire et affaire de gros sous
<https://www.capital.fr/entreprises-marches/le-diabete-enjeu-sanitaire-planetaire-et-affaire-de-gros-sous-1288704> (accessed Mar 25, 2020).
- (2) Lim, S. S.; Vos, T.; Flaxman, A. D.; Danaei, G.; Shibuya, K.; Adair-Rohani, H.; Amann, M.; Anderson, H. R.; Andrews, K. G.; Aryee, M.; Atkinson, C.; Bacchus, L. J.; Bahalim, A. N.; Balakrishnan, K.; Balmes, J.; Barker-Collo, S.; Baxter, A.; Bell, M. L.; Blore, J. D.; Blyth, F.; Bonner, C.; Borges, G.; Bourne, R.; Boussinesq, M.; Brauer, M.; Brooks, P.; Bruce, N. G.; Brunekreef, B.; Bryan-Hancock, C.; Bucello, C.; Buchbinder, R.; Bull, F.; Burnett, R. T.; Byers, T. E.; Calabria, B.; Carapetis, J.; Carnahan, E.; Chafe, Z.; Charlson, F.; Chen, H.; Chen, J. S.; Cheng, A. T.-A.; Child, J. C.; Cohen, A.; Colson, K. E.; Cowie, B. C.; Darby, S.; Darling, S.; Davis, A.; Degenhardt, L.; Dentener, F.; Des Jarlais, D. C.; Devries, K.; Dherani, M.; Ding, E. L.; Dorsey, E. R.; Driscoll, T.; Edmond, K.; Ali, S. E.; Engell, R. E.; Erwin, P. J.; Fahimi, S.; Falder, G.; Farzadfar, F.; Ferrari, A.; Finucane, M. M.; Flaxman, S.; Fowkes, F. G. R.; Freedman, G.; Freeman, M. K.; Gakidou, E.; Ghosh, S.; Giovannucci, E.; Gmel, G.; Graham, K.; Grainger, R.; Grant, B.; Gunnell, D.; Gutierrez, H. R.; Hall, W.; Hoek, H. W.; Hogan, A.; Hosgood, H. D.; Hoy, D.; Hu, H.; Hubbell, B. J.; Hutchings, S. J.; Ibeanusi, S. E.; Jacklyn, G. L.; Jasrasaria, R.; Jonas, J. B.; Kan, H.; Kanis, J. A.; Kassebaum, N.; Kawakami, N.; Khang, Y.-H.; Khatibzadeh, S.; Khoo, J.-P.; Kok, C.; Laden, F.; Lalloo, R.; Lan, Q.; Lathlean, T.; Leasher, J. L.; Leigh, J.; Li, Y.; Lin, J. K.; Lipshultz, S. E.; London, S.; Lozano, R.; Lu, Y.; Mak, J.; Malekzadeh, R.; Mallinger, L.; Marcenes, W.; March, L.; Marks, R.; Martin, R.; McGale, P.; McGrath, J.; Mehta, S.; Mensah, G. A.; Merriman, T. R.; Micha, R.; Michaud, C.; Mishra, V.; Hanafiah, K. M.; Mokdad, A. A.; Morawska, L.; Mozaffarian, D.; Murphy, T.; Naghavi, M.; Neal, B.; Nelson, P. K.; Nolla, J. M.; Norman, R.; Olives, C.; Omer, S. B.; Orchard, J.; Osborne, R.; Ostro, B.; Page, A.; Pandey, K. D.; Parry, C. D. H.; Passmore, E.; Patra, J.; Pearce, N.; Pelizzari, P. M.; Petzold, M.; Phillips, M. R.; Pope, D.; Pope III, C. A.; Powles, J.; Rao, M.; Razavi, H.; Rehfues, E. A.; Rehm, J. T.; Ritz, B.; Rivara, F. P.; Roberts, T.; Robinson, C.; Rodriguez-Portales, J. A.; Romieu, I.; Room, R.; Rosenfeld, L. C.; Roy, A.; Rushton, L.; Salomon, J. A.; Sampson, U.; Sanchez-Riera, L.; Sanman, E.; Sapkota, A.; Seedat, S.; Shi, P.; Shield, K.; Shivakoti, R.; Singh, G. M.; Sleet, D. A.; Smith, E.; Smith, K. R.; Stapelberg, N. J. C.; Steenland, K.; Stöckl, H.; Stovner, L. J.; Straif, K.; Straney, L.; Thurston, G. D.; Tran, J. H.; Van Dingenen, R.; van Donkelaar, A.; Veerman, J. L.; Vijayakumar, L.; Weintraub, R.; Weissman, M. M.; White, R. A.; Whiteford, H.; Wiersma, S. T.; Wilkinson, J. D.; Williams, H. C.; Williams, W.; Wilson, N.; Woolf, A. D.; Yip, P.; Zielinski, J. M.; Lopez, A. D.; Murray, C. J. L.; Ezzati, M. A Comparative Risk Assessment of Burden of Disease and Injury Attributable to 67 Risk Factors and Risk Factor Clusters in 21 Regions, 1990–2010: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* **2012**, *380* (9859), 2224–2260.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61766-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61766-8).
- (3) Mendis, S.; World Health Organization. *Global Status Report on Noncommunicable Diseases 2014*; 2014.
- (4) Obasse, I.; Taylor, M.; Fullwood, N. J.; Allsop, D. Development of Proteolytically Stable N-Methylated Peptide Inhibitors of Aggregation of the Amylin Peptide Implicated in Type 2 Diabetes. *Interface Focus* **2017**, *7* (6), 20160127. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2016.0127>.
- (5) Khatun, S.; Singh, A.; Mandal, D.; Chandra, A.; Gupta, A. N. Quantification of Protein Aggregation Rates and Quenching Effects of Amylin–Inhibitor Complexes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21* (36), 20083–20094. <https://doi.org/10.1039/C9CP03238J>.
- (6) Azzam, S. K.; Jang, H.; Choi, M. C.; Alsafar, H.; Lukman, S.; Lee, S. Inhibition of Human Amylin Aggregation and Cellular Toxicity by Lipoic Acid and Ascorbic Acid. *Mol. Pharmaceutics* **2018**, *15* (6), 2098–2106. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b01009>.
- (7) Matsko, A.; Liu, Z.; Helton, M.; Hughes, A.; Reeves, M. Early Detection of Amylin Aggregation with a Miniature Optical-Fiber Based Sensor. *GW Research Days 2016 - Present* **2017**.

- (8) Yoshimura, M.; Ono, M.; Watanabe, H.; Kimura, H.; Saji, H. Development of ^{99m}Tc-Labeled Pyridyl Benzofuran Derivatives To Detect Pancreatic Amylin in Islet Amyloid Model Mice. *Bioconjugate Chemistry* **2016**, *27* (6), 1532–1539. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00174>.
- (9) Watanabe, H.; Miki, Y.; Shimizu, Y.; Saji, H.; Ono, M. Synthesis and Evaluation of Novel Two-Photon Fluorescence Probes for in Vivo Imaging of Amylin Aggregates in the Pancreas. *Dyes and Pigments* **2019**, *170*, 107615. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107615>.
- (10) Martínez-Valbuena, I.; Valenti-Azcarate, R.; Amat-Villegas, I.; Riverol, M.; Marcilla, I.; Andrea, C. E. de; Sánchez-Arias, J. A.; Carmona-Abellan, M. del M.; Martí, G.; Erro, M.-E.; Martínez-Vila, E.; Tuñón, M.-T.; Luquin, M.-R. Amylin as a Potential Link between Type 2 Diabetes and Alzheimer Disease. *Annals of Neurology* **2019**, *86* (4), 539–551. <https://doi.org/10.1002/ana.25570>.
- (11) Bharadwaj, P.; Wijesekara, N.; Liyanapathirana, M.; Newsholme, P.; Ittner, L.; Fraser, P.; Verdile, G. The Link between Type 2 Diabetes and Neurodegeneration: Roles for Amyloid- β , Amylin, and Tau Proteins. *Journal of Alzheimer's Disease* **2017**, *59* (2), 421–432. <https://doi.org/10.3233/JAD-161192>.
- (12) Jackson, K.; Barisone, G. A.; Diaz, E.; Jin, L.; DeCarli, C.; Despa, F. Amylin Deposition in the Brain: A Second Amyloid in Alzheimer Disease?: Hyperamylinemia, Diabetes, AD. *Annals of Neurology* **2013**, *74* (4), 517–526. <https://doi.org/10.1002/ana.23956>.
- (13) Srodulski, S.; Sharma, S.; Bachstetter, A. B.; Brelfoard, J. M.; Pascual, C.; Xie, X. S.; Saatman, K. E.; Van Eldik, L. J.; Despa, F. Neuroinflammation and Neurologic Deficits in Diabetes Linked to Brain Accumulation of Amylin. *Mol Neurodegener* **2014**, *9*, 30. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-30>.
- (14) Lacerda, S.; Morfin, J.-F.; Geraldès, C. F. G. C.; Tóth, É. Metal Complexes for Multimodal Imaging of Misfolded Protein-Related Diseases. *Dalton Trans.* **2017**, *46* (42), 14461–14474. <https://doi.org/10.1039/C7DT02371E>.
- (15) Selkoe, D. J. The Cell Biology of Beta-Amyloid Precursor Protein and Presenilin in Alzheimer's Disease. *Trends Cell Biol.* **1998**, *8* (11), 447–453.
- (16) Patterson, C.; Feightner, J. W.; Garcia, A.; Hsiung, G.-Y. R.; MacKnight, C.; Sadovnick, A. D. Diagnosis and Treatment of Dementia: 1. Risk Assessment and Primary Prevention of Alzheimer Disease. *Canadian Medical Association Journal* **2008**, *178* (5), 548–556. <https://doi.org/10.1503/cmaj.070796>.
- (17) Interaction of amylin species with transition metals and membranes | Elsevier Enhanced Reader <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0162013418304409?token=F199A8B7457FDF79769595EFC1087DD157FC9AD2A1DAD20072B185FAA568475E3B6EE726A8A9A6C9211F42FCE88BA634> (accessed Oct 29, 2019). <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.11.004>.
- (18) Stridsberg, M.; Wilander, E. Islet Amyloid Polypeptide (IAPP) A Short Review. *Acta Oncologica* **1991**, *30* (4), 451–456. <https://doi.org/10.3109/02841869109092400>.
- (19) Caillon, L.; Hoffmann, A. R. F.; Botz, A.; Khemtémourian, L. Molecular Structure, Membrane Interactions, and Toxicity of the Islet Amyloid Polypeptide in Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes Research* **2016**, *2016*, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2016/5639875>.
- (20) Knowles, T. P. J.; Waudby, C. A.; Devlin, G. L.; Cohen, S. I. A.; Aguzzi, A.; Vendruscolo, M.; Terentjev, E. M.; Welland, M. E.; Dobson, C. M. An Analytical Solution to the Kinetics of Breakable Filament Assembly. *Science* **2009**, *326* (5959), 1533–1537. <https://doi.org/10.1126/science.1178250>.
- (21) Eichner, T.; Kalverda, A. P.; Thompson, G. S.; Homans, S. W.; Radford, S. E. Conformational Conversion during Amyloid Formation at Atomic Resolution. *Mol Cell* **2011**, *41* (2–4), 161–172. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.11.028>.
- (22) Iannuzzi, C.; Irace, G.; Sirangelo, I. The Effect of Glycosaminoglycans (GAGs) on Amyloid Aggregation and Toxicity. *Molecules* **2015**, *20* (2), 2510–2528. <https://doi.org/10.3390/molecules20022510>.

- (23) Haass, C.; Selkoe, D. J. Soluble Protein Oligomers in Neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's Amyloid β -Peptide. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2007**, *8* (2), 101–112. <https://doi.org/10.1038/nrm2101>.
- (24) Kanatsuka, A.; Kou, S.; Makino, H. IAPP/Amylin and β -Cell Failure: Implication of the Risk Factors of Type 2 Diabetes. *Diabetology International* **2018**, *9* (3), 143–157. <https://doi.org/10.1007/s13340-018-0347-1>.
- (25) Jayasinghe, S. A.; Langen, R. Membrane Interaction of Islet Amyloid Polypeptide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2007**, *1768* (8), 2002–2009. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.01.022>.
- (26) Faller, P.; Hureau, C.; Berthoumieu, O. Role of Metal Ions in the Self-Assembly of the Alzheimer's Amyloid- β Peptide. *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (21), 12193–12206. <https://doi.org/10.1021/ic4003059>.
- (27) Faller, P.; Hureau, C. Bioinorganic Chemistry of Copper and Zinc Ions Coordinated to Amyloid- β Peptide. *Dalton Trans.* **2009**, No. 7, 1080–1094. <https://doi.org/10.1039/B813398K>.
- (28) Taylor, C. G. Zinc, the Pancreas, and Diabetes: Insights from Rodent Studies and Future Directions. *Biometals* **2005**, *18* (4), 305–312. <https://doi.org/10.1007/s10534-005-3686-x>.
- (29) Patel, K.; Kumar, A.; Durani, S. Analysis of the Structural Consensus of the Zinc Coordination Centers of Metalloprotein Structures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2007**, *1774* (10), 1247–1253. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.07.010>.
- (30) Brender, J. R.; Hartman, K.; Nanga, R. P. R.; Popovych, N.; de la Salud Bea, R.; Vivekanandan, S.; Marsh, E. N. G.; Ramamoorthy, A. Role of Zinc in Human Islet Amyloid Polypeptide Aggregation. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (26), 8973–8983. <https://doi.org/10.1021/ja1007867>.
- (31) DeToma, A. S.; Salamekh, S.; Ramamoorthy, A.; Lim, M. H. Misfolded Proteins in Alzheimer's Disease and Type II Diabetes. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (2), 608–621. <https://doi.org/10.1039/C1CS15112F>.
- (32) Brender, J. R.; Krishnamoorthy, J.; Messina, G. M. L.; Deb, A.; Vivekanandan, S.; La Rosa, C.; Penner-Hahn, J. E.; Ramamoorthy, A. Zinc Stabilization of Prefibrillar Oligomers of Human Islet Amyloid Polypeptide. *Chem. Commun. (Camb.)* **2013**, *49* (32), 3339–3341. <https://doi.org/10.1039/c3cc40383a>.
- (33) Sarell, C. J.; Syme, C. D.; Rigby, S. E. J.; Viles, J. H. Copper(II) Binding to Amyloid- β Fibrils of Alzheimer's Disease Reveals a Picomolar Affinity: Stoichiometry and Coordination Geometry Are Independent of A β Oligomeric Form. *Biochemistry* **2009**, *48* (20), 4388–4402. <https://doi.org/10.1021/bi900254n>.
- (34) del Barrio, M.; Borghesani, V.; Hureau, C.; Faller, P. Metal-Binding to Amyloid- β Peptide: Coordination, Aggregation and Reactive Oxygen Species Production. In *Biometals in Neurodegenerative Diseases 1st Edition - Mechanisms and Therapeutics*; White, A., Aschner, M., Costa, L., Bush, A., Eds.; Elsevier, 2017.
- (35) Jiang, D.; Zhang, L.; Grant, G. P. G.; Dudzik, C. G.; Chen, S.; Patel, S.; Hao, Y.; Millhauser, G. L.; Zhou, F. The Elevated Copper Binding Strength of Amyloid- β Aggregates Allows the Sequestration of Copper from Albumin: A Pathway to Accumulation of Copper in Senile Plaques. *Biochemistry* **2013**, *52* (3), 547–556. <https://doi.org/10.1021/bi301053h>.
- (36) Atrián-Blasco, E.; Gonzalez, P.; Santoro, A.; Alies, B.; Faller, P.; Hureau, C. Cu and Zn Coordination to Amyloid Peptides: From Fascinating Chemistry to Debated Pathological Relevance. *Coordination Chemistry Reviews* **2018**, *371*, 38–55. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.04.007>.
- (37) Riba, I.; Barran, P. E.; Cooper, G. J. S.; Unwin, R. D. On the Structure of the Copper–Amylin Complex. *International Journal of Mass Spectrometry* **2015**, *391*, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2015.09.001>.
- (38) Chen, Y. W.; Yang, C. Y.; Huang, C. F.; Hung, D. Z.; Leung, Y. M.; Liu, S. H. Heavy Metals, Islet Function and Diabetes Development. *Islets* **2009**, *1* (3), 169–176. <https://doi.org/10.4161/isl.1.3.9262>.

- (39) He, L.; Wang, X.; Zhao, C.; Zhu, D.; Du, W. Inhibition of Human Amylin Fibril Formation by Insulin-Mimetic Vanadium Complexes. *Metallomics* **2014**, *6* (5), 1087–1096. <https://doi.org/10.1039/C4MT00021H>.
- (40) Cohen, F. E.; Kelly, J. W. Therapeutic Approaches to Protein-Misfolding Diseases. *Nature* **2003**, *426* (6968), 905–909. <https://doi.org/10.1038/nature02265>.
- (41) Yang, D.-S.; Yip, C. M.; Huang, T. H. J.; Chakrabartty, A.; Fraser, P. E. Manipulating the Amyloid- β Aggregation Pathway with Chemical Chaperones. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (46), 32970–32974. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.46.32970>.
- (42) Härd, T.; Lendel, C. Inhibition of Amyloid Formation. *Journal of Molecular Biology* **2012**, *421* (4–5), 441–465. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.12.062>.
- (43) Maji, S. K.; Perrin, M. H.; Sawaya, M. R.; Jessberger, S.; Vadodaria, K.; Rissman, R. A.; Singru, P. S.; Nilsson, K. P. R.; Simon, R.; Schubert, D.; Eisenberg, D.; Rivier, J.; Sawchenko, P.; Vale, W.; Riek, R. Functional Amyloids as Natural Storage of Peptide Hormones in Pituitary Secretory Granules. *Science* **2009**, *325* (5938), 328–332. <https://doi.org/10.1126/science.1173155>.
- (44) Lange, J. L.; Hayne, D. J.; Roselt, P.; McLean, C. A.; White, J. M.; Donnelly, P. S. A Gallium(III) Schiff Base-Curcumin Complex That Binds to Amyloid- β Plaques. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *162*, 274–279. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.02.029>.
- (45) Ramogida, C. F.; Orvig, C. Tumour Targeting with Radiometals for Diagnosis and Therapy. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (42), 4720. <https://doi.org/10.1039/c3cc41554f>.
- (46) Zhu, L.; Ploessl, K.; Kung, H. F. PET/SPECT Imaging Agents for Neurodegenerative Diseases. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (19), 6683–6691. <https://doi.org/10.1039/C3CS60430F>.
- (47) Song, J.; Peng, X.; Li, L.; Yang, F.; Zhang, X.; Zhang, J.; Dai, J.; Cui, M. Al18F-NODA Benzothiazole Derivatives as Imaging Agents for Cerebrovascular Amyloid in Cerebral Amyloid Angiopathy. *ACS Omega* **2018**, *3* (10), 13089–13096. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01120>.
- (48) Rouchette, K.; Salabert, A. S.; Castanié, I.; Beaurain, M.; Alonso, M.; Tafani, M.; Payoux, P. Mise en place d'une production d'eau marquée à l'oxygène 15 à l'aide d'un automate Hidex. *Médecine Nucléaire* **2018**, *42* (3), 153. <https://doi.org/10.1016/j.mednuc.2018.03.053>.
- (49) Zechmann, C. M.; Afshar-Oromieh, A.; Armor, T.; Stubbs, J. B.; Mier, W.; Hadaschik, B.; Joyal, J.; Kopka, K.; Debus, J.; Babich, J. W.; Haberkorn, U. Radiation Dosimetry and First Therapy Results with a 124I/131I-Labeled Small Molecule (MIP-1095) Targeting PSMA for Prostate Cancer Therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2014**, *41* (7), 1280–1292. <https://doi.org/10.1007/s00259-014-2713-y>.
- (50) Fissers, J.; Waldron, A.-M.; De Vijlder, T.; Van Broeck, B.; Pemberton, D. J.; Mercken, M.; Van Der Veken, P.; Joossens, J.; Augustyns, K.; Dedeurwaerdere, S.; Stroobants, S.; Staelens, S.; wyffels, L. Synthesis and Evaluation of a Zr-89-Labeled Monoclonal Antibody for Immuno-PET Imaging of Amyloid- β Deposition in the Brain. *Mol Imaging Biol* **2016**, *18* (4), 598–605. <https://doi.org/10.1007/s11307-016-0935-z>.
- (51) Wadas, T. J.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Anderson, C. J. Coordinating Radiometals of Copper, Gallium, Indium, Yttrium, and Zirconium for PET and SPECT Imaging of Disease. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (5), 2858–2902. <https://doi.org/10.1021/cr900325h>.
- (52) Gillies, R. J. In Vivo Molecular Imaging. *Journal of Cellular Biochemistry* **2002**, *87* (S39), 231–238. <https://doi.org/10.1002/jcb.10450>.
- (53) Wernick, M. N.; Aarsvold, J. N. *Emission Tomography: The Fundamentals of PET and SPECT*; Elsevier, 2004.
- (54) Martins, A. F.; Morfin, J.-F.; Kubíčková, A.; Kubíček, V.; Buron, F.; Suzenet, F.; Salerno, M.; Lazar, A. N.; Duyckaerts, C.; Arlicot, N.; Guilloteau, D.; Geraldès, C. F. G. C.; Tóth, É. PiB-Conjugated, Metal-Based Imaging Probes: Multimodal Approaches for the Visualization of β -Amyloid Plaques. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4* (5), 436–440. <https://doi.org/10.1021/ml400042w>.
- (55) Cressier, D.; Dhilly, M.; Cao Pham, T. T.; Fillesoye, F.; Gourand, F.; Maïza, A.; Martins, A. F.; Morfin, J.-F.; Geraldès, C. F. G. C.; Tóth, É.; Barré, L. Gallium-68 Complexes Conjugated to

- Pittsburgh Compound B: Radiolabeling and Biological Evaluation. *Molecular Imaging and Biology* **2016**, *18* (3), 334–343. <https://doi.org/10.1007/s11307-015-0906-9>.
- (56) Boros, E.; Packard, A. B. Radioactive Transition Metals for Imaging and Therapy. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (2), 870–901. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00281>.
- (57) Gupta, S.; Batra, S.; Jain, M. Antibody Labeling with Radioiodine and Radiometals. *Methods Mol Biol* **2014**, *1141*, 147–157. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0363-4_9.
- (58) Pearson, R. G. Hard and Soft Acids and Bases, HSAB, Part 1: Fundamental Principles. *Journal of Chemical Education* **1968**, *45* (9), 581. <https://doi.org/10.1021/ed045p581>.
- (59) Kiel, M. *Chimie organique*; De Boeck Secundair, 2004.
- (60) Atkins, P. W. *Shriver & Atkins' Inorganic Chemistry*; Oxford University Press: Oxford; New York, 2010.
- (61) Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. *Chem. Rev.* **1999**, *99* (9), 2293–2352. <https://doi.org/10.1021/cr980440x>.
- (62) Ahrens, L. H. The Use of Ionization Potentials Part 1. Ionic Radii of the Elements. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **1952**, *2* (3), 155–169. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(52\)90004-5](https://doi.org/10.1016/0016-7037(52)90004-5).
- (63) Perazella, M. A. Current Status of Gadolinium Toxicity in Patients with Kidney Disease. *CJASN* **2009**, *4* (2), 461–469. <https://doi.org/10.2215/CJN.06011108>.
- (64) Dekkers, I. A.; Roos, R.; van der Molen, A. J. Gadolinium Retention after Administration of Contrast Agents Based on Linear Chelators and the Recommendations of the European Medicines Agency. *Eur Radiol* **2018**, *28* (4), 1579–1584. <https://doi.org/10.1007/s00330-017-5065-8>.
- (65) Rogosnitzky, M.; Branch, S. Gadolinium-Based Contrast Agent Toxicity: A Review of Known and Proposed Mechanisms. *Biometals* **2016**, *29* (3), 365–376. <https://doi.org/10.1007/s10534-016-9931-7>.
- (66) Kanda, T.; Fukusato, T.; Matsuda, M.; Toyoda, K.; Oba, H.; Kotoku, J.; Haruyama, T.; Kitajima, K.; Furui, S. Gadolinium-Based Contrast Agent Accumulates in the Brain Even in Subjects without Severe Renal Dysfunction: Evaluation of Autopsy Brain Specimens with Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy. *Radiology* **2015**, *276* (1), 228–232. <https://doi.org/10.1148/radiol.2015142690>.
- (67) McDonald, R. J.; McDonald, J. S.; Kallmes, D. F.; Jentoft, M. E.; Murray, D. L.; Thielen, K. R.; Williamson, E. E.; Eckel, L. J. Intracranial Gadolinium Deposition after Contrast-Enhanced MR Imaging. *Radiology* **2015**, *275* (3), 772–782. <https://doi.org/10.1148/radiol.15150025>.
- (68) Brücher, E.; Tircsó, G.; Baranyai, Z.; Kovács, Z.; Sherry, A. D. Stability and Toxicity of Contrast Agents. In *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*; John Wiley & Sons, Ltd, 2013; pp 157–208. <https://doi.org/10.1002/9781118503652.ch4>.
- (69) Hermann, P.; Kotek, J.; Kubíček, V.; Lukeš, I. Gadolinium(III) Complexes as MRI Contrast Agents: Ligand Design and Properties of the Complexes. *Dalton Trans.* **2008**, No. 23, 3027. <https://doi.org/10.1039/b719704g>.
- (70) Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. *Chem. Rev.* **1999**, *99* (9), 2293–2352. <https://doi.org/10.1021/cr980440x>.
- (71) *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging: Helm/The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*; Merbach, A., Helm, L., Tóth, É., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2013.
- (72) Tei, L.; Baranyai, Z.; Gaino, L.; Forgács, A.; Vágner, A.; Botta, M. Thermodynamic Stability, Kinetic Inertness and Relaxometric Properties of Monoamide Derivatives of Lanthanide(III) DOTA Complexes. *Dalton Trans.* **2015**, *44* (12), 5467–5478. <https://doi.org/10.1039/C4DT03939D>.
- (73) Bloembergen, N.; Purcell, E. M.; Pound, R. V. Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption. *Phys. Rev.* **1948**, *73* (7), 679–712. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.73.679>.

- (74) Solomon, I. Relaxation Processes in a System of Two Spins. *Phys. Rev.* **1955**, *99* (2), 559–565. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.99.559>.
- (75) Solomon, I.; Bloembergen, N. Nuclear Magnetic Interactions in the HF Molecule. *J. Chem. Phys.* **1956**, *25* (2), 261–266. <https://doi.org/10.1063/1.1742867>.
- (76) Bloembergen, N. Proton Relaxation Times in Paramagnetic Solutions. *J. Chem. Phys.* **1957**, *27* (2), 572–573. <https://doi.org/10.1063/1.1743771>.
- (77) Martins, A. F. Multimodal Imaging Probes for the Diagnostics of Alzheimer’s Disease. **2013**.
- (78) Skovronsky, D. M.; Zhang, B.; Kung, M.-P.; Kung, H. F.; Trojanowski, J. Q. In Vivo Detection of Amyloid Plaques in a Mouse Model of Alzheimer’s Disease. **6**.
- (79) Puchtler, H.; Sweat, F.; Levine, M. ON THE BINDING OF CONGO RED BY AMYLOID. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **1962**, *10* (3), 355–364. <https://doi.org/10.1177/10.3.355>.
- (80) LeVine, H. Mechanism of A β (1–40) Fibril-Induced Fluorescence of (*Trans* , *Trans*)-1-Bromo-2,5-Bis(4-Hydroxystyryl)Benzene (K114) [†]. *Biochemistry* **2005**, *44* (48), 15937–15943. <https://doi.org/10.1021/bi051252l>.
- (81) Volkova, K.; Kovalska, V.; Segers-Nolten, G.; Veldhuis, G.; Subramaniam, V.; Yarmoluk, S. Explorations of the Application of Cyanine Dyes for Quantitative α -Synuclein Detection. *Biotechnic & Histochemistry* **2009**, *84* (2), 55–61. <https://doi.org/10.1080/10520290902798799>.
- (82) Volkova, K. D.; Kovalska, V. B.; Balanda, A. O.; Vermeij, R. J.; Subramaniam, V.; Slominskii, Yu. L.; Yarmoluk, S. M. Cyanine Dye–Protein Interactions: Looking for Fluorescent Probes for Amyloid Structures. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **2007**, *70* (5), 727–733. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2007.03.008>.
- (83) Volkova, K. D.; Kovalska, V. B.; Yu. Losytskyy, M.; Veldhuis, G.; Segers-Nolten, G. M. J.; Tolmachev, O. I.; Subramaniam, V.; Yarmoluk, S. M. Studies of Interaction Between Cyanine Dye T-284 and Fibrillar Alpha-Synuclein. *J Fluoresc* **2010**, *20* (6), 1267–1274. <https://doi.org/10.1007/s10895-010-0678-1>.
- (84) Mena, R.; Edwards, P.; Pérez-Olvera, O.; Wischik, C. M. Monitoring Pathological Assembly of Tau and β -Amyloid Proteins in Alzheimer’s Disease. *Acta Neuropathol* **1995**, *89* (1), 50–56. <https://doi.org/10.1007/BF00294259>.
- (85) Santa-María, I.; Pérez, M.; Hernández, F.; Avila, J.; Moreno, F. J. Characteristics of the Binding of Thioflavin S to Tau Paired Helical Filaments. *Journal of Alzheimer’s Disease* **2006**, *9* (3), 279–285. <https://doi.org/10.3233/JAD-2006-9307>.
- (86) Ziaunys, M.; Smirnovas, V. Additional Thioflavin-T Binding Mode in Insulin Fibril Inner Core Region. *The Journal of Physical Chemistry B* **2019**, *123* (41), 8727–8732. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b08652>.
- (87) Groenning, M.; Norrman, M.; Flink, J. M.; van de Weert, M.; Bukrinsky, J. T.; Schluckebier, G.; Frokjaer, S. Binding Mode of Thioflavin T in Insulin Amyloid Fibrils. *Journal of Structural Biology* **2007**, *159* (3), 483–497. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.06.004>.
- (88) Groenning, M. Binding Mode of Thioflavin T and Other Molecular Probes in the Context of Amyloid Fibrils—Current Status. *J Chem Biol* **2009**, *3* (1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s12154-009-0027-5>.
- (89) Reinke, A. A.; Gestwicki, J. E. Insight into Amyloid Structure Using Chemical Probes. *Chemical Biology & Drug Design* **2011**, *77* (6), 399–411. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2011.01110.x>.
- (90) Mallik, A.; Drzezga, A.; Minoshima, S. Clinical Amyloid Imaging. *Seminars in Nuclear Medicine* **2017**, *47* (1), 31–43. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2016.09.005>.
- (91) Chen, M. S.; Walker, J.; Prusoff, W. H. Kinetic Studies of Herpes Simplex Virus Type 1-Encoded Thymidine and Thymidylate Kinase, a Multifunctional Enzyme. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254* (21), 10747–10753.
- (92) Uzuegbunam, B. C.; Librizzi, D.; Hooshyar Yousefi, B. PET Radiopharmaceuticals for Alzheimer’s Disease and Parkinson’s Disease Diagnosis, the Current and Future Landscape. *Molecules* **2020**, *25* (4), 977. <https://doi.org/10.3390/molecules25040977>.

- (93) Snellman, A.; Rokka, J.; Lopez-Picon, F. R.; Eskola, O.; Wilson, I.; Farrar, G.; Scheinin, M.; Solin, O.; Rinne, J. O.; Haaparanta-Solin, M. Pharmacokinetics of [18F]Flutemetamol in Wild-Type Rodents and Its Binding to Beta Amyloid Deposits in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2012**, *39* (11), 1784–1795. <https://doi.org/10.1007/s00259-012-2178-9>.
- (94) Juréus, A.; Swahn, B.-M.; Sandell, J.; Jeppsson, F.; Johnson, A. E.; Johnström, P.; Neelissen, J. A. M.; Sunnemark, D.; Farde, L.; Svensson, S. P. S. Characterization of AZD4694, a Novel Fluorinated A β Plaque Neuroimaging PET Radioligand. *Journal of Neurochemistry* **2010**, *114* (3), 784–794. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06812.x>.
- (95) Ryu, E. K.; Choe, Y. S.; Lee, K.-H.; Choi, Y.; Kim, B.-T. Curcumin and Dehydrozingerone Derivatives: Synthesis, Radiolabeling, and Evaluation for β -Amyloid Plaque Imaging[†]. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (20), 6111–6119. <https://doi.org/10.1021/jm0607193>.
- (96) Rokka, J.; Snellman, A.; Zona, C.; La Ferla, B.; Nicotra, F.; Salmona, M.; Forloni, G.; Haaparanta-Solin, M.; Rinne, J. O.; Solin, O. Synthesis and Evaluation of a 18F-Curcumin Derivate for β -Amyloid Plaque Imaging. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2014**, *22* (9), 2753–2762. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.03.010>.
- (97) Mourtas, S.; Lazar, A. N.; Markoutsas, E.; Duyckaerts, C.; Antimisiaris, S. G. Multifunctional Nanoliposomes with Curcumin–Lipid Derivative and Brain Targeting Functionality with Potential Applications for Alzheimer Disease. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *80*, 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.04.050>.
- (98) Trembath, L.; Newell, M.; Devous, M. D. Technical Considerations in Brain Amyloid PET Imaging with 18F-Florbetapir. *J. Nucl. Med. Technol.* **2015**, *43* (3), 175–184. <https://doi.org/10.2967/jnmt.115.156679>.
- (99) Chen, M.; Du, Z.-Y.; Zheng, X.; Li, D.-L.; Zhou, R.-P.; Zhang, K. Use of Curcumin in Diagnosis, Prevention, and Treatment of Alzheimer's Disease. *Neural Regeneration Research* **2018**, *13* (4), 742. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.230303>.
- (100) Yanagisawa, D.; Shirai, N.; Amatsubo, T.; Taguchi, H.; Hirao, K.; Urushitani, M.; Morikawa, S.; Inubushi, T.; Kato, M.; Kato, F.; Morino, K.; Kimura, H.; Nakano, I.; Yoshida, C.; Okada, T.; Sano, M.; Wada, Y.; Wada, K.; Yamamoto, A.; Tooyama, I. Relationship between the Tautomeric Structures of Curcumin Derivatives and Their A β -Binding Activities in the Context of Therapies for Alzheimer's Disease. *Biomaterials* **2010**, *31* (14), 4179–4185. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.142>.
- (101) Yanagisawa, D.; Amatsubo, T.; Morikawa, S.; Taguchi, H.; Urushitani, M.; Shirai, N.; Hirao, K.; Shiino, A.; Inubushi, T.; Tooyama, I. 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* **2011**, *184*, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.03.071>.
- (102) Ran, C.; Xu, X.; Raymond, S. B.; Ferrara, B. J.; Neal, K.; Bacskai, B. J.; Medarova, Z.; Moore, A. Design, Synthesis, and Testing of Difluoroboron-Derivatized Curcumins as Near-Infrared Probes for in Vivo Detection of Amyloid- β Deposits. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (42), 15257–15261. <https://doi.org/10.1021/ja9047043>.
- (103) Chen, M.; Du, Z.-Y.; Zheng, X.; Li, D.-L.; Zhou, R.-P.; Zhang, K. Use of Curcumin in Diagnosis, Prevention, and Treatment of Alzheimer's Disease. *Neural Regen Res* **2018**, *13* (4), 742–752. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.230303>.
- (104) Yoshimura, M.; Ono, M.; Watanabe, H.; Kimura, H.; Saji, H. Feasibility of Amylin Imaging in Pancreatic Islets with β -Amyloid Imaging Probes. *Scientific Reports* **2015**, *4* (1). <https://doi.org/10.1038/srep06155>.
- (105) Watanabe, H.; Yoshimura, M.; Sano, K.; Shimizu, Y.; Kaide, S.; Nakamoto, Y.; Togashi, K.; Ono, M.; Saji, H. Characterization of Novel 18F-Labeled Phenoxymethylpyridine Derivatives as Amylin Imaging Probes. *Mol. Pharmaceutics* **2018**, *15* (12), 5574–5584. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00756>.

- (106) Templin, A. T.; Meier, D. T.; Willard, J. R.; Wolden-Hanson, T.; Conway, K.; Lin, Y.-G.; Gillespie, P. J.; Bokvist, K. B.; Attardo, G.; Kahn, S. E.; Scheuner, D.; Hull, R. L. Use of the PET Ligand Florbetapir for in Vivo Imaging of Pancreatic Islet Amyloid Deposits in HIAPP Transgenic Mice. *Diabetologia* **2018**, *61* (10), 2215–2224. <https://doi.org/10.1007/s00125-018-4695-y>.
- (107) Lu, Z.; Xie, J.; Yan, R.; Yu, Z.; Sun, Z.; Yu, F.; Gong, X.; Feng, H.; Lu, J.; Zhang, Y. A Pilot Study of Pancreatic Islet Amyloid PET Imaging with [18F]FDDNP: *Nuclear Medicine Communications* **2018**, *39* (7), 659–664. <https://doi.org/10.1097/MNM.0000000000000849>.
- (108) Watanabe, H.; Kawano, K.; Shimizu, Y.; Iikuni, S.; Nakamoto, Y.; Togashi, K.; Ono, M. Development of Novel PET Imaging Probes for Detection of Amylin Aggregates in the Pancreas. *Mol. Pharmaceutics* **2020**, *17* (4), 1293–1299. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b01309>.
- (109) Poduslo, J. F.; Wengenack, T. M.; Curran, G. L.; Wisniewski, T.; Sigurdsson, E. M.; Macura, S. I.; Borowski, B. J.; Jack, C. R. Molecular Targeting of Alzheimer’s Amyloid Plaques for Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging. *Neurobiology of Disease* **2002**, *11* (2), 315–329. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2002.0550>.
- (110) Poduslo, J. F.; Ramakrishnan, M.; Holasek, S. S.; Ramirez-Alvarado, M.; Kandimalla, K. K.; Gilles, E. J.; Curran, G. L.; Wengenack, T. M. In Vivo Targeting of Antibody Fragments to the Nervous System for Alzheimer’s Disease Immunotherapy and Molecular Imaging of Amyloid Plaques. *Journal of Neurochemistry* **2007**, *102* (2), 420–433. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04591.x>.
- (111) Bort, G.; Catoen, S.; Borderies, H.; Keksi, A.; Ballet, S.; Louin, G.; Port, M.; Ferroud, C. Gadolinium-Based Contrast Agents Targeted to Amyloid Aggregates for the Early Diagnosis of Alzheimer’s Disease by MRI. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *87*, 843–861. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.016>.
- (112) Vithanarachchi, S. M.; Allen, M. J. A Multimodal, β -Amyloid-Targeted Contrast Agent. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (39), 4148–4150. <https://doi.org/10.1039/C2CC36583A>.
- (113) Martins, A. F.; Morfin, J.-F.; Geraldès, C. F. G. C.; Tóth, É. Gd³⁺ Complexes Conjugated to Pittsburgh Compound B: Potential MRI Markers of β -Amyloid Plaques. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2014**, *19* (2), 281–295. <https://doi.org/10.1007/s00775-013-1055-8>.
- (114) Martins, A. F.; Dias, D. M.; Morfin, J.-F.; Lacerda, S.; Laurents, D. V.; Tóth, É.; Geraldès, C. F. G. C. Interaction of PiB-Derivative Metal Complexes with Beta-Amyloid Peptides: Selective Recognition of the Aggregated Forms. *Chemistry - A European Journal* **2015**, *21* (14), 5413–5422. <https://doi.org/10.1002/chem.201406152>.
- (115) Martins, A. F.; Oliveira, A. C.; Morfin, J.-F.; Laurents, D. V.; Tóth, É.; Geraldès, C. F. G. C. Associating a Negatively Charged GdDOTA-Derivative to the Pittsburgh Compound B for Targeting A β Amyloid Aggregates. *J Biol Inorg Chem* **2016**, *21* (1), 83–99. <https://doi.org/10.1007/s00775-015-1316-9>.
- (116) Pansieri, J.; Plissonneau, M.; Stransky-Heilkron, N.; Dumoulin, M.; Heinrich-Balard, L.; Rivory, P.; Morfin, J.-F.; Toth, E.; Saraiva, M. J.; Allémann, E.; Tillement, O.; Forge, V.; Lux, F.; Marquette, C. Multimodal Imaging Gd-Nanoparticles Functionalized with Pittsburgh Compound B or a Nanobody for Amyloid Plaques Targeting. *Nanomedicine* **2017**, *12* (14), 1675–1687. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0079>.
- (117) Costa, P. M.; Wang, J. T.-W.; Morfin, J.-F.; Khanum, T.; To, W.; Sosabowski, J.; Tóth, E.; Al-Jamal, K. T. Functionalised Carbon Nanotubes Enhance Brain Delivery of Amyloid-Targeting Pittsburgh Compound B (PiB)-Derived Ligands. *Nanotheranostics* **2018**, *2* (2), 168–183. <https://doi.org/10.7150/ntno.23125>.
- (118) Zhang, X.; Yu, P.; Yang, Y.; Hou, Y.; Peng, C.; Liang, Z.; Lu, J.; Chen, B.; Dai, J.; Liu, B.; Cui, M.^{99m}Tc-Labeled 2-Arylbenzothiazoles: A β Imaging Probes with Favorable Brain Pharmacokinetics for Single-Photon Emission Computed Tomography. *Bioconjugate Chemistry* **2016**, *27* (10), 2493–2504. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00444>.

- (119) Zhang, X.; Hou, Y.; Peng, C.; Wang, C.; Wang, X.; Liang, Z.; Lu, J.; Chen, B.; Dai, J.; Liu, B.; Cui, M. Oligoethyleneoxy-Modified ^{99m}Tc-Labeled β -Amyloid Imaging Probes with Improved Brain Pharmacokinetics for Single-Photon Emission Computed Tomography. *Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *61* (3), 1330–1339. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01834>.
- (120) Fu, H.; Tu, P.; Zhao, L.; Dai, J.; Liu, B.; Cui, M. Amyloid- β Deposits Target Efficient Near-Infrared Fluorescent Probes: Synthesis, in Vitro Evaluation, and in Vivo Imaging. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (3), 1944–1950. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04441>.

Chapitre II :

Complexes avec un

bras de ciblage -

synthèse et

caractérisation

1. Introduction

Comme décrit dans le chapitre précédent, différents complexes, comme le ML1 (Figure II.1), ont été déjà étudiés au sein de l'équipe, dans le cadre de la détection des plaques amyloïdes A β , biomarqueur de la maladie d'Alzheimer^{1,2}.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons voulu améliorer la structure de ces complexes pour optimiser la détection des agrégats de type amyloïdes. Nous avons donc synthétisé les complexes ML2 et ML3 (Figure II.1). Nous avons gardé, pour l'unité complexante, une structure macrocyclique de type DO3A-monoamide. En effet, la stabilité thermodynamique et l'inertie cinétique de ces derniers ont largement été étudiées et les études ont prouvé l'efficacité de ces structures³ (Voir chapitre I ; paragraphe 8.2 Agent de contraste IRM).

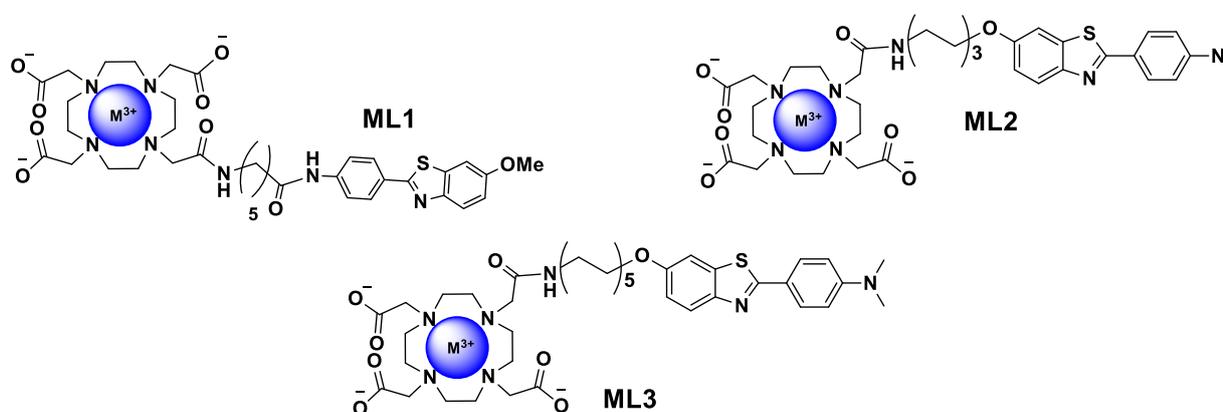


Figure II.1: Les structures des complexes ML1-3 .

Les structures de ces complexes varient par le site d'attache du dérivé PiB et par la nature et la longueur de l'espaceur. Par rapport au composé L1, les ligands L2 et L3 présentent une chaîne alkyle plus longue, respectivement de 6 et 10 carbones et l'unité ciblante PiB est attachée *via* une fonction éther. Ces modulations ont pour but d'augmenter les affinités des complexes ML2 et ML3 en éloignant la partie ciblante de la partie sonde d'imagerie, et donc de limiter les interactions non-spécifiques⁴. De plus, il a été montré que ce sens d'attache du dérivé du PiB avec un groupement amine diméthylé libre était plus favorable à la reconnaissance des agrégats des peptides amyloïdes^{5,6}.

Enfin, il est important de noter que la lipophilie de ces complexes sera aussi modulée. La lipophilie est caractérisée par le coefficient de partition octanol/eau (log P). Ainsi on peut s'attendre à une augmentation de ce paramètre du GdL1 au GdL2 et GdL3. En effet, la charge globale neutre à pH physiologique sera conservée, car la fonction amine du dérivé

benzothiazol possède un pK_a de 4.2⁷ et la suppression d'une fonction amide et l'allongement de la chaîne alkyle devrait avoir pour conséquence une augmentation de la lipophilie.

Ceci peut modifier le comportement de ces composés en solution (formation de micelles) et peut avoir une influence sur leur biodistribution. Il a ainsi été montré que, par exemple, un log P de 2-3⁸ était le plus favorable au franchissement de la barrière hématoencéphalique. Cependant, des composés trop lipophiles auront tendance à être plutôt capté par le foie, ce qui pourrait être néfaste à la détection des agrégats d'amyline au niveau du pancréas.

Dans ce chapitre, nous décrivons premièrement la synthèse des nouveaux ligands, puis nous caractériserons le comportement des complexes de Gd(III) en solution. Les études concernant les interactions entre les complexes et les peptides amyloïdes, et l'influence des complexes sur le processus d'agrégation des peptides seront présentées dans le chapitre suivant.

2. Synthèse des ligands L2 et L3

Les ligands sont composés de trois unités : une unité ciblante qui est un dérivé du PiB, un espaceur sous forme de chaîne alkyle et une troisième unité, macrocyclique de type DO3A mono amide, qui servira de complexant pour l'ion métallique (Ln(III)).

2.1 Synthèse de l'unité ciblante : aryl benzothiazole ABT

La synthèse du dérivé du PiB a été longuement décrite^{9,10-12}. Nous avons donc suivi le même chemin synthétique.

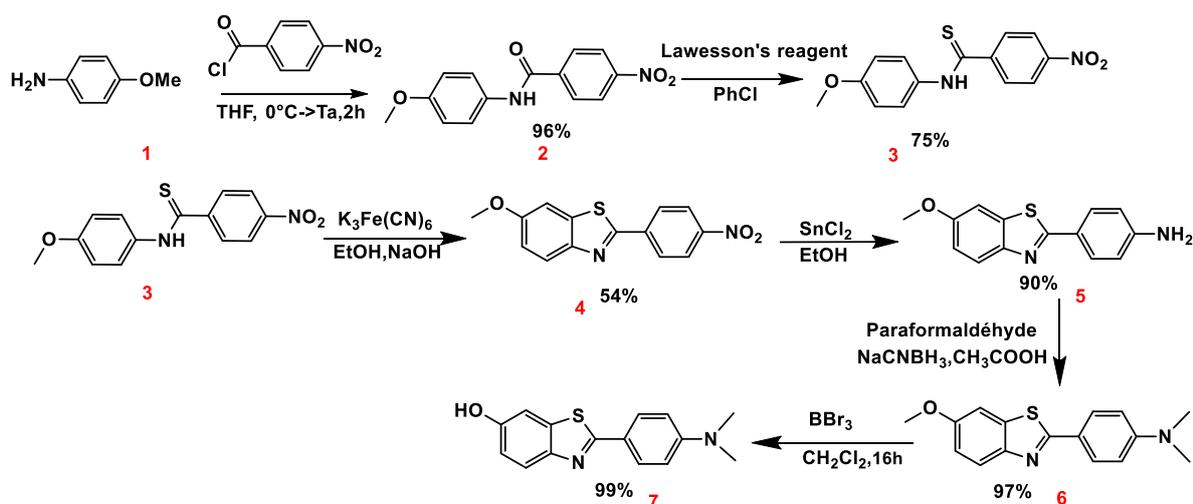


Schéma II.1: Synthèse de l'unité ciblante.

La première partie de la synthèse débute par la partie ciblante, dérivée du Pittsburgh compound B (schéma II.1) suivant les procédures de la littérature¹³. L'acylation du 4-méthoxyaniline (**1**) en présence du chlorure-4-nitrobenzoyl dans du THF conduit à la formation du composé (**2**) avec un rendement quasi quantitatif. A l'aide du réactif de Lawesson, une sulfuration conduit à l'obtention du composé (**3**) avec un rendement de 75%. Le composé (**4**) est obtenu suite à une cyclisation de Jacobson en position *ortho* du méthoxyphényle pour former le dérivé du benzothiazole, en utilisant le ferricyanure de potassium avec un rendement de 54%.

Le groupement nitro est réduit en amine en présence du chlorure d'étain dans l'éthanol pour obtenir le composé (**5**) avec un rendement de 90%. Cette amine primaire générée subit une double méthylation par amination réductrice en présence du paraformaldéhyde combiné à l'action du réducteur NaCNBH₃. Ceci va conduire à l'amine tertiaire (**6**) avec un rendement de 97%. Le tribromure de bore, acide fort de Lewis, est utilisé pour déméthylmer le méthoxyphényle.

2.2 Introduction du linker

L'alcool généré (**7**) va être alkylé pour introduire l'espaceur (schéma II.2). Ce dernier devra porter une fonction amine à son extrémité pour permettre l'introduction du groupe acétamide. La fonction amine sera générée par une méthode de Gabriel.

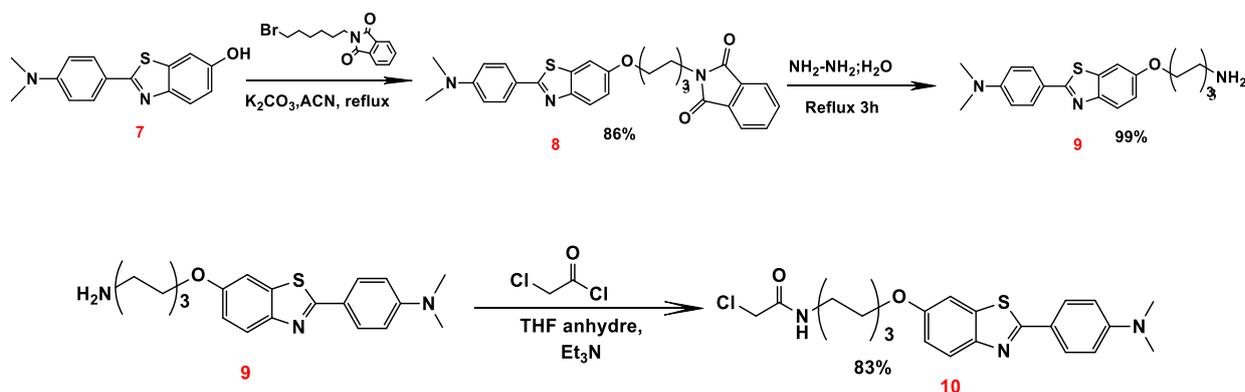


Schéma II.2: Réaction de Gabriel pour ajouter le linker du L2¹⁴.

La première étape consiste en une substitution nucléophile en milieu basique permettant l'ajout du N-(2-bromohexyl)phthalimide commercial sur l'alcool (**7**), ce qui donne le composé (**8**). L'amine (**9**) sera ensuite obtenue quantitativement suite à une procédure d'Ing-Manske dans l'hydrate d'hydrazine au reflux.

La présence d'un halogène, un groupement partant est nécessaire pour l'introduction du bras portant l'unité ciblante sur le macrocyle. Cette fonctionnalisation est générée par une acylation du composé (9) avec le chlorure de chloroacétyle dans du THF anhydre et en présence de la triéthylamine donnant, par la suite, l'amide correspondant (10) avec un rendement de 83%. Ce ligand a déjà été synthétisé et reporté dans une étude sur l'efficacité des nanotubes de carbones fonctionnalisés avec des ligands L2 et L3 (Voir paragraphe 8.2.6 dans le chapitre I)¹⁴.

Dans le cas du ligand L3, le linker à 10 chaînons est obtenu suite à une réaction de Gabriel avec le dibromodécane en excès avec du phtalimide dans du DMF en milieu basique (schéma II.3). Ensuite, le composé (15) est obtenu de la même manière que le composé (10).

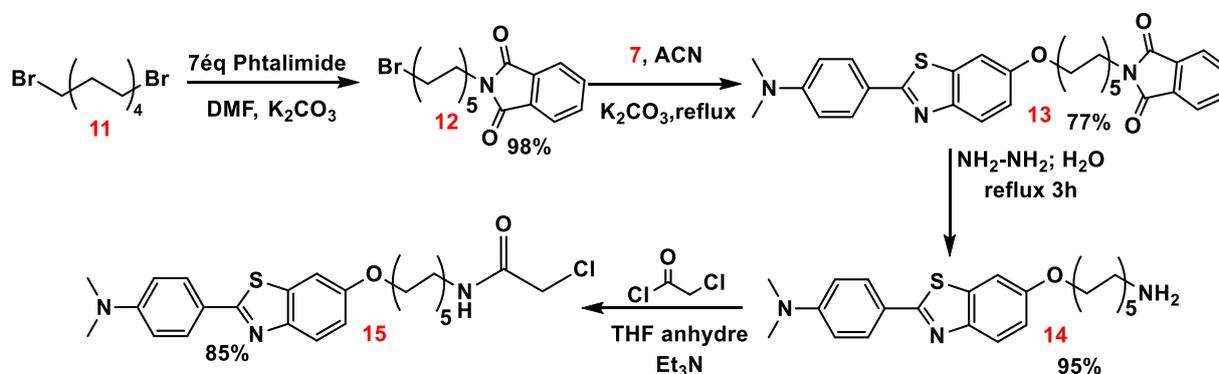


Schéma II.3: Synthèse du bras du L3.

2.3 Introduction du macrocyle

La dernière partie de la synthèse du ligand consiste à une réaction de substitution nucléophile entre les composés 10 ou 15 et le DO3A-*t*Bu commercial.

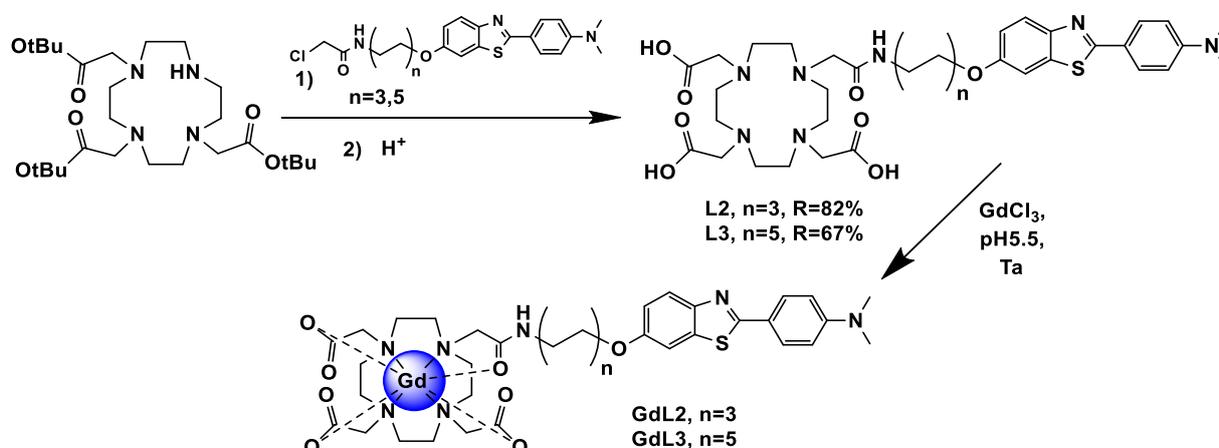


Schéma II.4 : Introduction du macrocyle et formation des complexes de gadolinium à pH 5.5

La réaction se fait dans un milieu anhydre, à température ambiante, en présence d'une base pendant 48h dans l'acétonitrile. Les fonctions ester *ter*-butyles sont labiles en milieu acide. Ainsi les ligands L2 et L3 sont obtenus suite à l'action de l'acide trifluoroacétique. Le rendement global de synthèse pour chacun des deux ligands est : L2 =15% (12 étapes) ; L3=10% (13 étapes).

Ensuite, les complexes sont préparés suite à un mélange équimolaire de ligand et de GdCl₃ aqueux. Lors de la complexation, le pH est ajusté continuellement à 5,5.

3. Caractérisation des complexes GdL1-3

3.1 Coefficient de partition, log P

Afin de décrire le caractère lipophile/hydrophile des agents d'imagerie, nous avons déterminé leur coefficient de partition (log P). Le log P est le logarithme du ratio des concentrations du composé dans la phase organique (octanol) et dans la phase aqueuse.

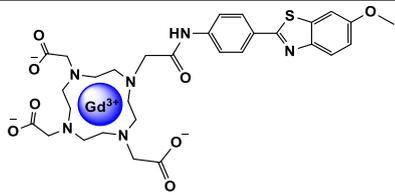
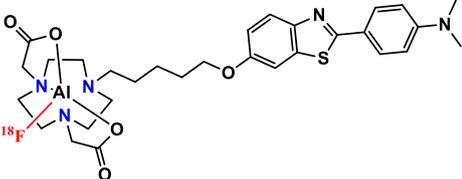
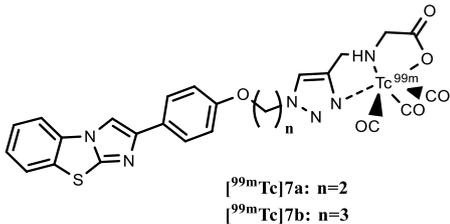
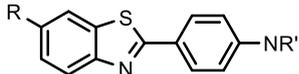
$$\log P = \log \frac{[GdLx]_{\text{octanol}}}{[GdLx]_{\text{eau}}} \quad \text{II.1}$$

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau II.1.

La lipophilie des molécules est importante également pour leur affinité aux peptides amyloïdes¹⁶; un log P plus élevé conduit à une meilleure affinité, même si évidemment ce n'est pas l'unique facteur déterminant¹⁷. Le GdL3 est le plus hydrophobe des 3 complexes grâce à sa chaîne alkyle de 10 carbones, comme montre sa valeur de log P = 1.46, proche de celle du PiB (log P = 1.23). Ce dernier possède une très forte affinité vis-à-vis le peptide Aβ₁₋₄₀ avec une constante d'inhibition K_i=4.3nM. GdL2 avec une chaîne alkyle de 6 carbones a un caractère hydrophobe aussi proche que celui du complexe Al¹⁸F-NODA (Figure I.24), caractérisé par une bonne affinité au peptide Aβ₁₋₄₂ (ayant une structure très similaire à l'Aβ₁₋₄₀ mais qui s'agrège plus rapidement) avec un K_i=11,3 nM. De plus, Al¹⁸F-NODA a montré une accumulation intéressante au niveau du pancréas, (4.96±0.38%ID/g)⁵.

En résumé, les valeurs de log P permettent de prévoir que nos nouveaux complexes auront probablement plus d'affinité¹⁸ aux peptides amyloïdes par rapport au GdL1 qui est caractérisé par une constante de dissociation de K_D=67.8μM¹². Gd(DO3A-PiB), étant le complexe le plus hydrophile, est le moins affiné aux peptides amyloïdes parmi les sondes citées, avec un K_D=170μM¹¹.

Tableau II.1: Valeurs de log P déterminées pour les complexes de GdL1-3 et d'autres composés analogues.

Structures	Complexes	LogP
	Gd(DO3A-PiB)	-0.15 ¹¹
Figure II.1	GdL1	0,03 ¹⁰
Figure II.1	GdL2	0,63
Figure II.1	GdL3	1,46
	[¹⁸ F]17 ou Al ¹⁸ F-NODA	0,74 ⁵
	[^{99m} Tc]7a [^{99m} Tc]7b	1.08 ¹⁵ 1.10 ¹⁵
 PiB: R=OH, R'=CH ₃ 1 : R=OMe, R'= CH ₃ 2 : R=OMe, R'=(CH ₃) ₂	PiB 1 2	1.23 ¹⁶ 1.9 ¹³ 3.3 ¹³

➤ Les Règles de Lipinski

Le log P rentre également dans les considérations des règles de Lipinski qui permettent d'estimer le pouvoir d'un composé à passer les barrières biologiques (barrière digestive, paroi capillaire...) et donc sa biodisponibilité biologique suite à une administration orale chez le sujet sain. Ces règles s'appliquent également au passage de la barrière hématoencéphalique, ce qui serait important pour la détection de l'Aβ dans la maladie d'Alzheimer. Les composés dont les propriétés physico-chimiques répondent à ces critères (typiquement au moins 4 sur les 5)¹⁹ sont susceptibles d'avoir une perméabilité dans le sens de passage passif à travers les

différentes barrières biologiques et donc seront des médicaments avec une activité suite à une administration orale.

Les règles de Lipinski sont :

- Poids moléculaires < 500Da
- Log P<5
- Nombre de donneurs de liaisons hydrogènes <5
- Nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène <10

Les valeurs de log P <5 de nos complexes, et le fait qu'ils possèdent un nombre inférieur à 5 de donneur de liaison hydrogène (1 atome d'azote), seraient alors en faveur d'un passage à travers des barrières biologiques et notamment la BHE. Néanmoins, leur poids moléculaire est supérieur à la limite.

3.2 Détermination de la Concentration Micellaire Critique (CMC)

La CMC correspond à la concentration au-dessus de laquelle les molécules amphiphiles passent d'un état monomérique à une forme micellaire dans une solution (Figure II.2). La formation des micelles dépend de plusieurs paramètres, comme la concentration, la température, la nature du solvant, la force ionique... Dans une solution aqueuse et à faible concentration, les molécules amphiphiles sont dispersées de façon isolée dans l'eau, et s'accumulent à la surface avec leur partie hydrophobe pointant vers l'air et la partie hydrophile vers l'eau. Ceci permet de baisser la tension à l'interface eau/air jusqu'à une valeur minimale de saturation de l'interface. Au-delà de cette concentration, les micelles commencent à se former²⁰. L'auto-assemblage dans une solution aqueuse vise à diminuer les interactions défavorables, entre les parties hydrophiles et hydrophobes. Typiquement, les systèmes optent pour une forme sphérique de l'ordre du nanomètre.

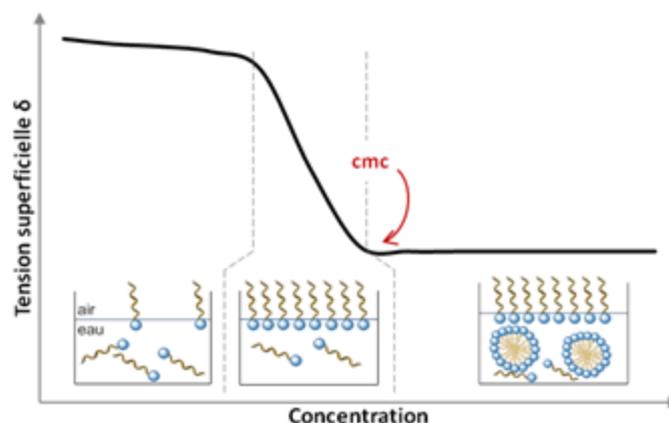


Figure II.2: Illustration de la formation des micelles.

Des molécules amphiphiles « classiques » sont constituées d'une queue hydrophobe et d'une partie hydrophile. Dans notre cas, la partie hydrophobe est la chaîne alkyle associée au dérivé du PiB, et la partie hydrophile est le complexe métallique.

3.2.2 Techniques de détermination de la CMC

Plusieurs moyens permettent la détermination de la CMC. La plupart des variations des propriétés physico-chimiques peut être utilisée pour la détermination de la CMC : la tension de surface, la conductivité électrique (pour un tensioactif chargé), la pression osmotique, la diffusion de lumière ainsi que les propriétés optiques des composés en cas d'inhibition suite à un changement de structure par exemple.

Pour la détermination de la CMC des agents de contraste, et notamment des complexes de gadolinium(III), une autre technique très adaptée est la relaxométrie²¹.

3.2.2.1 Relaxométrie

La CMC d'un complexe paramagnétique peut être déterminée par relaxométrie à partir de la variation de la vitesse de la relaxation paramagnétique, R_{1p} en fonction de la concentration, suivie à une fréquence où la rotation a une influence sur la relaxivité (typiquement entre 20 et 60 MHz). Plus la rotation est lente (forme micellaire), plus la relaxivité est élevée à ces fréquences en particulier, où la différence de relaxivité entre l'état monomère et l'état micellaire des molécules sera la plus marquée. La vitesse de la relaxation paramagnétique est calculée selon $R_{1p} = R_{1obs} - R_{1dia}$, où R_{1obs} est la vitesse de relaxation observée dans la solution du complexe et R_{1dia} est la vitesse de relaxation diamagnétique (sans complexe paramagnétique). En représentant la vitesse de la relaxation paramagnétique en fonction de la concentration, on obtient une droite dont la pente donne la relaxivité, r_1 . La valeur de la CMC correspond alors à la concentration du complexe à partir de laquelle il y a une augmentation de la pente, comme le montre la figure II.3. A des concentrations inférieures à la CMC, seuls les monomères contribuent au taux de relaxation paramagnétique, par contre, au-delà de cette concentration, le taux de relaxation mesuré est la somme des contributions des monomères (présents à une concentration correspondante à la CMC) et des micelles.

i. Cas de GdL1

Dans l'exemple du complexe GdL1, la valeur de la CMC déterminée par relaxométrie est de $1.00 \pm 0.02 \text{ mM}^{10}$ (Figure II.3).

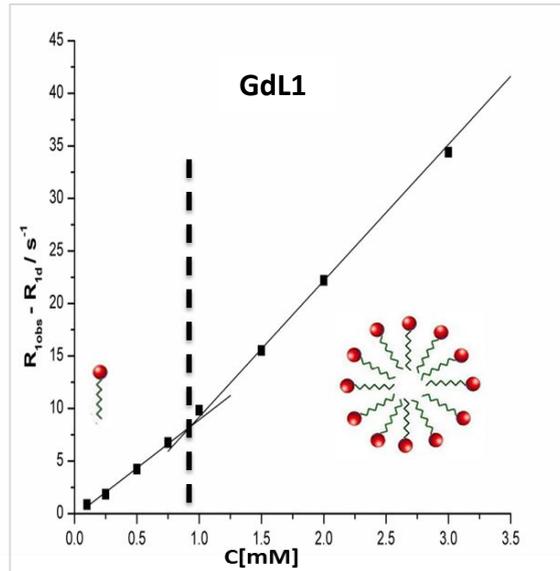


Figure II.3: Détermination de la CMC du GdL1 dans l'eau par relaxométrie.

Il est important à préciser que la limite inférieure de détection de la CMC par cette technique est de l'ordre de la centaine de micromolaire, au-dessous, les vitesses de relaxation ne peuvent pas être déterminées avec certitude.

ii. Cas de GdL2 et GdL3

Nous avons mesuré les vitesses de relaxation dans des solutions de GdL2 en fonction de la concentration, mais nous n'avons pas réussi à déterminer une CMC puisqu'il n'y a pas un changement de la pente (Figure II.4), ce qui veut certainement dire que la valeur de CMC est inférieure à la dernière concentration étudiée, c'est-à-dire 0,2 mM.

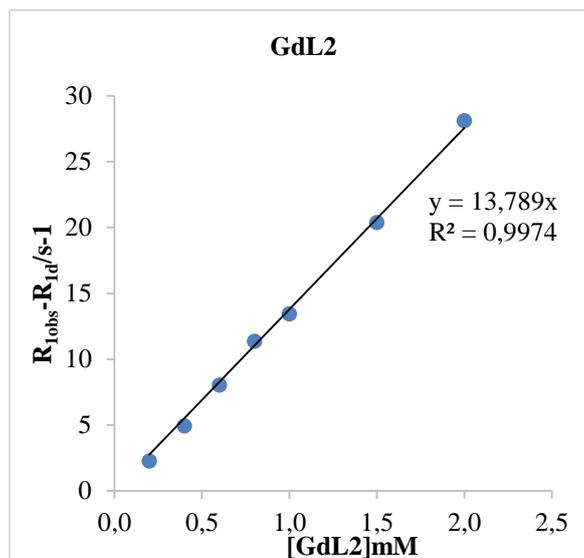


Figure II.4: Détermination de la CMC de GdL2 dans l'eau par relaxométrie.

Il en est de même avec GdL3.

iii. Bilan

En représentant les vitesses de relaxation de proton en fonction de la concentration du complexe, GdL1 a présenté une rupture de pente à 1 mM, ce qui correspond à la valeur de CMC de ce complexe. En ce qui concerne GdL2 et GdL3, la CMC semble être plus faible que la dernière concentration étudiée et n'a pas pu être déterminée.

Bien que la relaxométrie soit une technique fiable et précise pour la détermination de la CMC, elle reste limitée à des concentrations supérieures à ~0.1 mM. De ce fait, des techniques plus sensibles sont nécessaires. C'est pourquoi nous nous sommes orientés vers les spectroscopies UV-vis et fluorescence en utilisant les propriétés optiques du dérivé PiB.

3.2.2.2 UV-Vis

i. Cas du GdL1

Afin d'étudier l'effet de la structure en solution sur les propriétés optiques des complexes, nous avons commencé toutes nos études par le complexe GdL1 qui nous servira comme référence. Après la détermination de la CMC par relaxométrie et vu la limite de détection assez élevée par rapport aux concentrations que nous voulons étudier, nous avons utilisé la spectroscopie UV-vis.

La figure II.5A montre les spectres d'absorption UV-Vis du GdL1 en fonction de la concentration. Les valeurs d'absorbance très élevées sont dues aux propriétés optiques du PiB, qui dans ce complexe possède un coefficient d'absorption molaire d'environ $12600 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. De ce fait, on prend en compte uniquement les mesures faites à des concentrations au dessous de $125 \mu\text{M}$, ce qui ne permet pas de couvrir la même gamme de concentration que dans les mesures relaxométriques, et de confirmer la CMC obtenue en relaxométrie.

En effet, le tracé du coefficient d'absorption molaire ainsi que l'absorbance normalisée à deux longueurs d'onde, 326 et 336nm en fonction de la concentration (Figure II.5.B et C), marque des intersections de courbes dans la même gamme de concentration ($11 \mu\text{M}$ et $15 \mu\text{M}$), Ceci veut dire qu'il y a un changement des propriétés optiques du complexe et donc un changement de structure (micellisation) de GdL1 dans cette gamme de concentration.

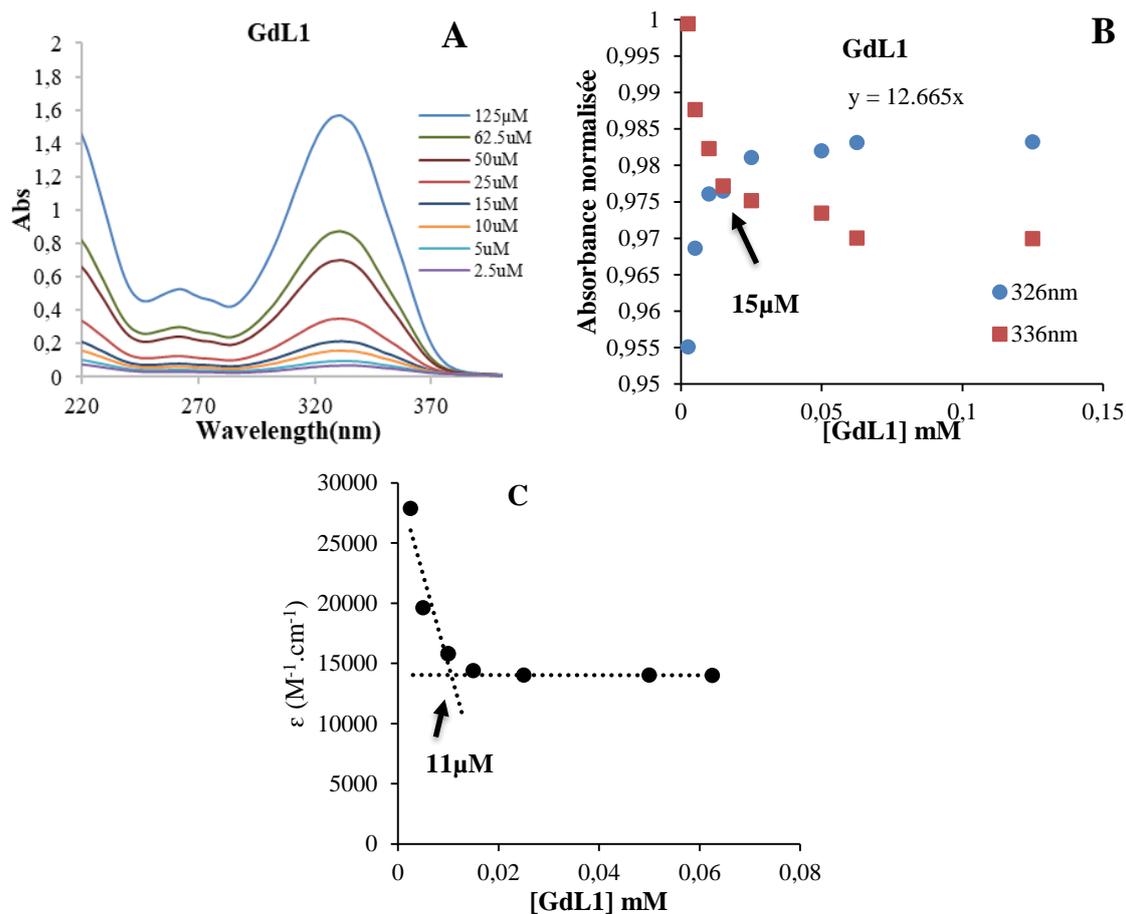


Figure II.5: Spectres UV-vis du GdL1 (A), Absorbance normalisée à $\lambda = 326\text{nm}$ et $\lambda = 336\text{nm}$ en fonction de la concentration de GdL1 (B), et le coefficient d'absorption molaire ϵ (M⁻¹ .cm⁻¹) en fonction de la concentration à $\lambda = 336\text{nm}$ (C) à pH 7 dans l'eau à 25°C, cuve de 1cm.

ii. Cas de GdL2

Dans le cas du GdL2, nous avons eu un coefficient d'extinction molaire moyen $\epsilon = 30800\text{dm}^3.\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Nous observons un effet hypsochrome au niveau de la longueur d'onde du maximum de l'absorbance de 360nm à 349nm en augmentant la concentration (Figure II.6A). Ceci semble marquer un changement de structure de GdL2 en solution en fonction de la concentration.

En traçant l'absorbance normalisée en fonction de la concentration de GdL2 aux deux longueurs d'ondes 349 et 360 nm (Figure II.6B), nous obtenons une intersection autour de 30 μM, mais avec une transition assez large. En traçant le coefficient d'absorption molaire en fonction de la concentration, à 349nm (Figure II.6C), on note une augmentation de ϵ avec la concentration et une stabilisation à $30800\text{dm}^3.\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ pour les concentrations les plus élevées. Ceci marque bien un changement des propriétés optiques et l'intersection des tangentes confirme bien la valeur de CMC autour de 30μM.

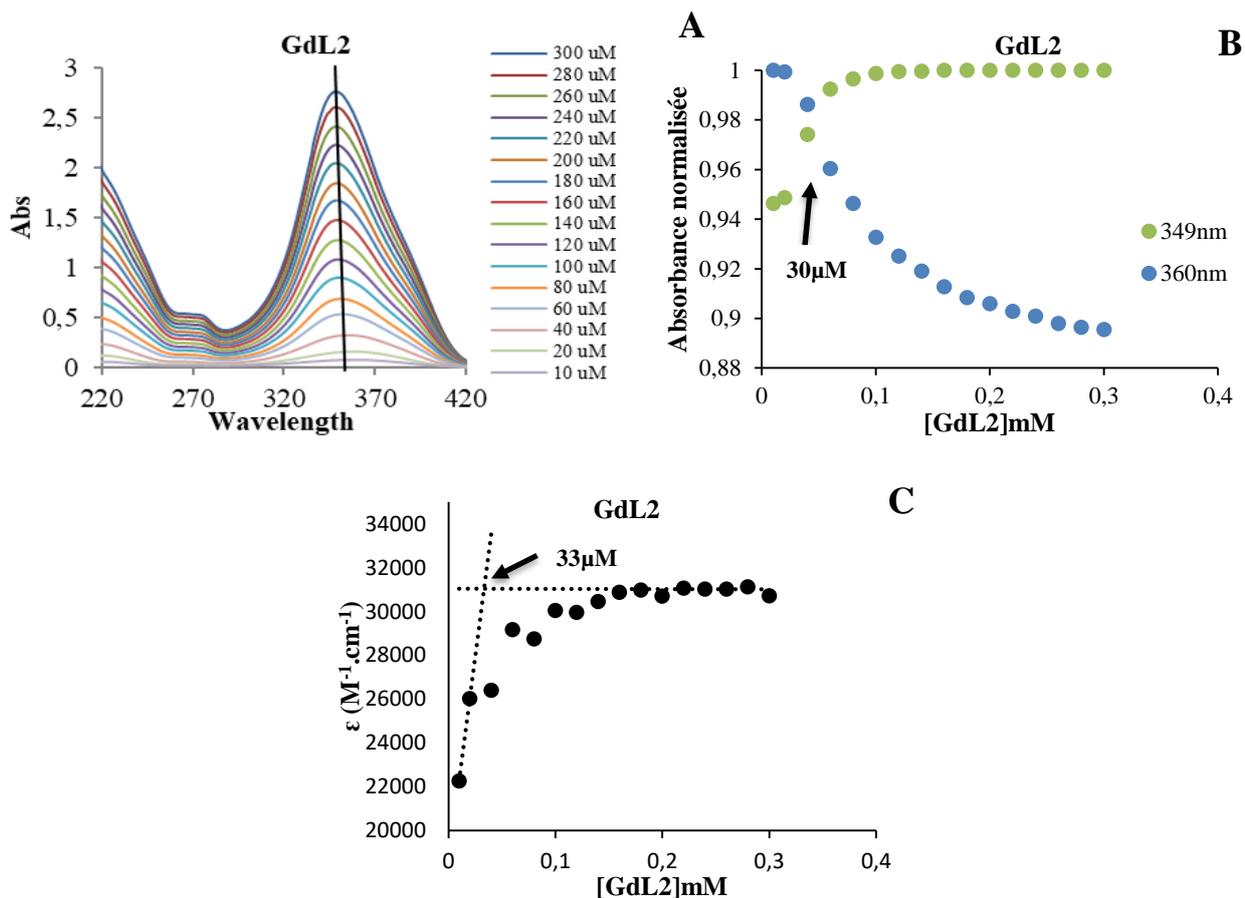


Figure II.6: Spectres UV-vis de GdL2 (A), Absorbance normalisée à $\lambda= 349\text{nm}$ et $\lambda=360\text{nm}$ en fonction de la concentration de GdL2 (B), et le coefficient d'absorption molaire ϵ en fonction de la concentration à $\lambda=349\text{nm}$ (C), à pH 7 dans l'eau à 25°C, cuve de 0.3cm.

Les valeurs d'absorbance étant très élevées même à de faibles concentrations, il nous était impossible de déterminer une valeur de CMC plus élevée, qui marquerait un autre éventuel changement de structure.

iii. Cas de GdL3

Puisque GdL3 est plus hydrophobe que GdL2 avec des log P respectifs de 1,46 et 0,63, nous pouvons supposer que sa valeur de CMC sera plus faible. Nous pouvons constater à partir de la figure II.7A qu'il y a, comme pour GdL2, un effet hypsochrome en augmentant la concentration.

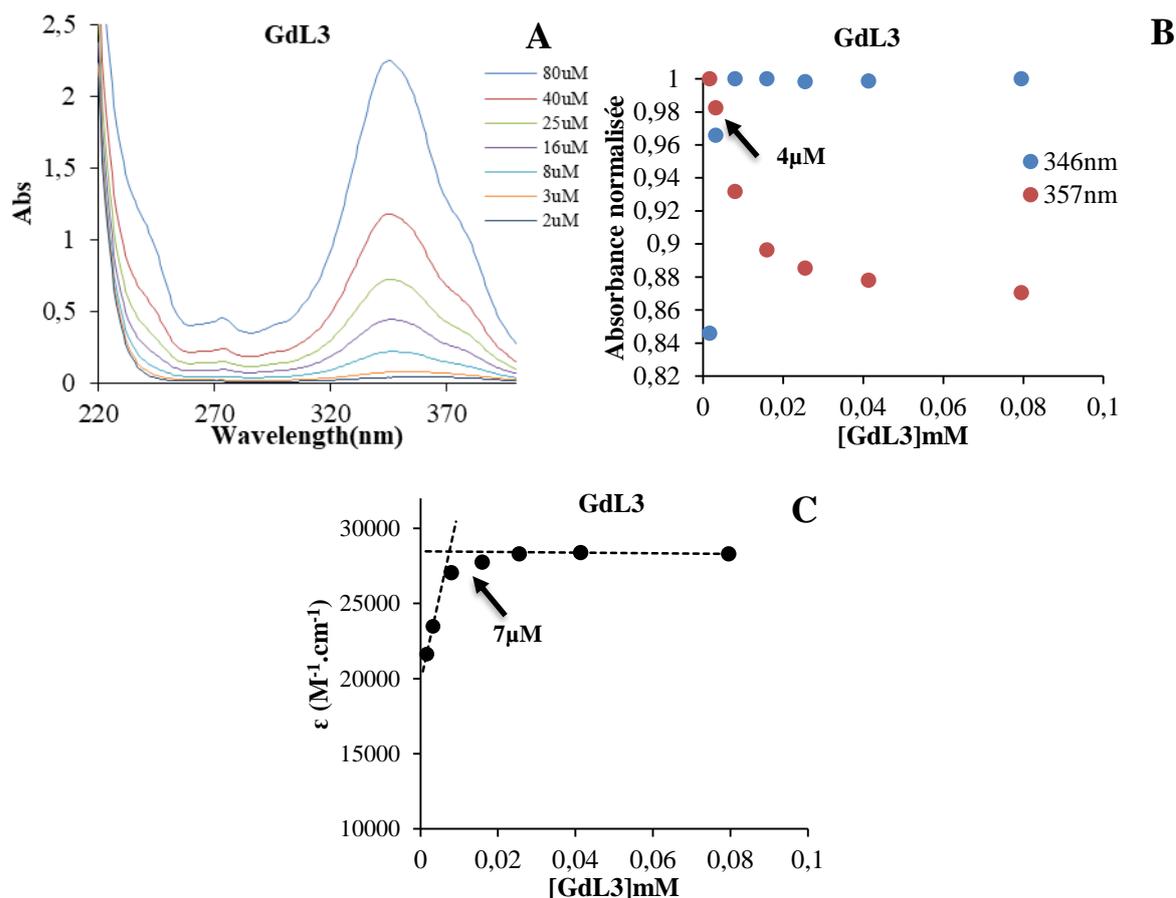


Figure II.7: Spectre UV-vis de GdL3 (A), Absorbance normalisée à $\lambda = 346$ nm et $\lambda = 357$ nm en fonction de la concentration de GdL3 (B), et le coefficient d'absorption molaire ϵ en fonction de la concentration à $\lambda = 346$ nm (C), à pH 7 dans l'eau à 25°C, cuve de 1 cm.

La figure II.7C montre une stabilisation du coefficient d'absorption molaire ϵ à la valeur $\epsilon = 28300 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, à partir de la concentration de 7 μM . Cette valeur peut être assimilée à la CMC de ce composé dans l'eau. Une concentration du même ordre de grandeur a été déterminée par l'intersection des courbes de l'absorbance normalisée en fonction de la concentration à deux longueurs d'ondes 346 et 357 nm, ces concentrations marquent un changement de structure du GdL3 dans la solution.

iv. Bilan

La spectroscopie UV-vis nous a permis de conclure que les propriétés spectroscopiques changent à une concentration donnée de nos complexes, et ces concentrations peuvent être interprétées comme une CMC. En effet, les 3 complexes présentent un effet hypsochrome, qui caractérise un changement de structure des composés en fonction de la concentration. Ainsi les CMC obtenues sont respectivement 15 μM , 30 μM et 5 μM pour GdL1, GdL2 et GdL3.

Par cette technique, étant donné que nos composés ont des coefficients d'absorption molaire d'environ $25\,000\text{ dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, on peut considérer que la limite de détection est de l'ordre du micromolaire. Or, nous approchons cette limite dans le cas des trois complexes GdL1-3. De plus, il n'est pas possible de détecter des changements pour des concentrations supérieures à 0,3 mM. Ceci fait de la spectroscopie UV-vis une méthode complémentaire, en terme de gamme de concentration, à la relaxométrie. Par conséquent, dans le cas de nos complexes, il a été impossible d'avoir des résultats concordants entre les deux techniques. C'est pourquoi nous allons utiliser les propriétés de fluorescence du PiB pour essayer de confirmer les résultats obtenus.

3.2.2.3 Fluorescence

La fluorescence est une technique plus sensible que la spectroscopie UV-vis. Nous allons l'utiliser pour confirmer les valeurs de CMC déterminées précédemment en mesurant les variations d'intensité d'émission en fonction de la concentration.

Les propriétés de fluorescence du dérivé de PiB devraient être influencées par l'agrégation. En effet, l'état micellaire des complexes engendre une auto-inhibition donc une diminution de l'intensité de l'émission, en accord avec la composition de la micelle où la partie hydrophobe est au niveau du cœur et la partie hydrophile forme la couronne. Donc, on peut supposer que lorsqu'on diminue la concentration du complexe et les micelles se dissocient, les parties hydrophobes deviennent plus distantes et l'auto-inhibition est moins marquée et donc l'émission de fluorescence augmente.

i. Cas de GdL1

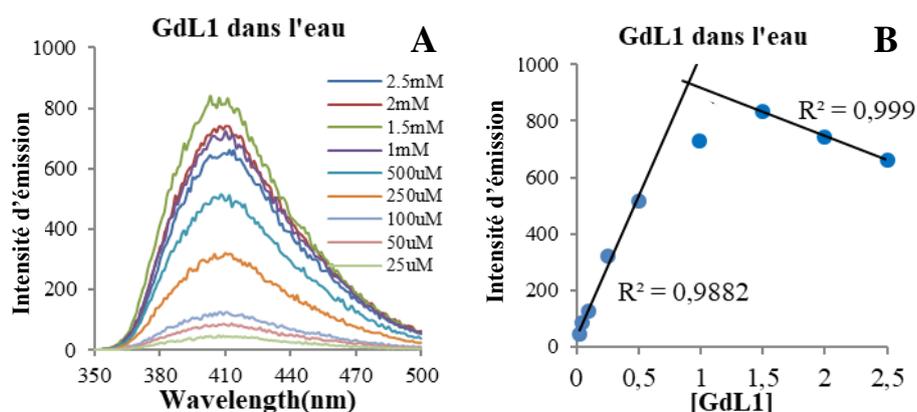


Figure II.8: Spectres d'émission de GdL1 dans l'eau, $\lambda_{\text{em}}=330\text{nm}$ (A) et intensités d'émission en fonction de la concentration de GdL1 $\lambda_{\text{ex}}=410\text{nm}$ (B) à 37°C , pH 7.

Chapitre II : Complexes avec un bras de ciblage

Lorsqu'on présente la variation de l'intensité en fonction de la concentration (Figure II.8B), on remarque une augmentation de l'intensité de la fluorescence avec la concentration, puis une diminution de cette intensité à partir de 1,5mM. Cette diminution est caractéristique du phénomène appelé « effet du filtre interne », où la diminution du signal est due à la réabsorption de la fluorescence. Le flux de la lumière émise est atténué en passant à travers une solution ayant une trop forte densité optique, c'est-à-dire une absorbance très élevée.

Bien que cette expérience permettrait de déterminer une CMC proche de celle obtenue en relaxométrie autour de 0,9 mM, il n'est pas possible de tenir compte de cette valeur puisque l'effet de filtre interne ne peut être négligé. En effet, à la concentration de 1mM et compte tenu du coefficient d'absorption molaire d'environ $12600 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, l'absorbance est beaucoup trop élevée ($A=12,6$).

D'une façon générale, la fluorescence est adaptée à faibles concentrations pour lesquelles l'absorbance est inférieure à 0,1. Dans ce cas, on peut négliger l'effet de filtre interne.

ii. Cas de GdL2

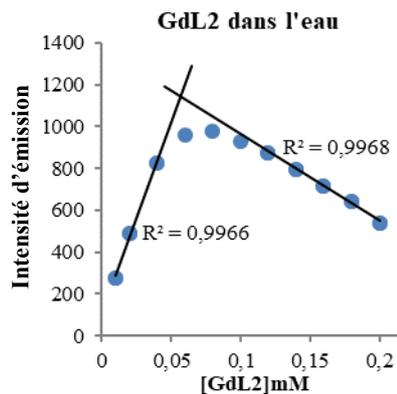


Figure II.9: Intensités d'émission en fonction de la concentration de GdL2, $\lambda_{em}=440\text{nm}$, à 37°C , pH 7.

Dans l'eau, GdL2, comme GdL1, met en évidence le même phénomène, la nonlinéarité de l'intensité d'émission en fonction de la concentration de GdL2. Le phénomène de filtre interne ne nous permet pas d'utiliser ces données pour la détermination de la CMC.

iii. Cas de GdL3

Concernant les mesures de fluorescence de GdL3 dans l'eau, il est évident que nous retrouvons le même effet, ce qui veut dire que nous ne pourrions pas déterminer des valeurs de CMC dans ce cas de figure non plus (Figure II.10B).

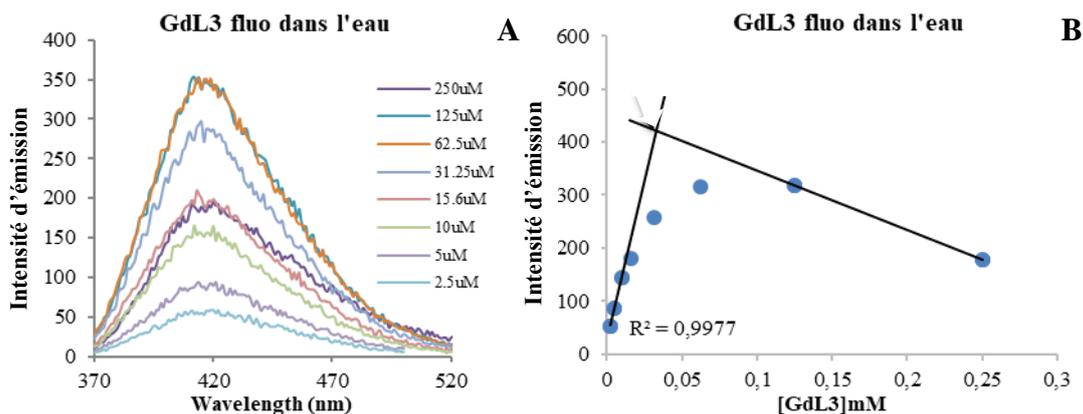


Figure II.10: Spectres d'émission de GdL3 dans l'eau, $\lambda_{ex}=350\text{nm}$ (A) et intensités d'émission en fonction de la concentration (B), à $\lambda_{em}=418\text{nm}$, à 37°C , pH 7.

iv. Bilan sur la fluorescence

Bien que la spectroscopie de fluorescence apparaisse comme une technique de choix, compte tenu des propriétés optiques de nos complexes, l'effet de filtre interne laisse planer un doute sur la fiabilité des résultats obtenus pour les concentrations les plus élevées où la densité optique des solutions est trop importante. C'est pourquoi les résultats de cette étude ne seront pas pris en compte par la suite.

Cependant, cette méthode pourrait s'avérer adéquate pour des concentrations sub-micromolaires. Ainsi, l'effet de filtre interne pourrait être négligé et il serait alors possible d'observer d'éventuels changements de structure en solution, invisibles en relaxométrie ou en spectroscopie UV-Vis.

3.2.3 Conclusion sur la partie détermination de la CMC

La CMC est un paramètre très important afin de comprendre le comportement de nos composés amphiphiles en solution. En effet, la présence d'agrégats micellaires peut influencer le mode d'interaction de ces complexes avec les peptides étudiés. La complexité des systèmes étudiés nous a poussé à utiliser différentes techniques pour la détermination de la CMC : la relaxométrie, la spectroscopie UV-vis et de la fluorescence. Le tableau II.2 rassemble les résultats obtenus lors de cette étude.

La relaxométrie et la spectroscopie UV-vis se sont avérées complémentaires en termes de gamme de concentration. Dans l'eau, les CMC respectives des complexes GdL1-3 diminuent de 1mM, à 0,015 mM. En reliant ces valeurs aux coefficients de partage octanol/eau mesurés précédemment, on retrouve la tendance selon laquelle la CMC diminue quand le log P augmente.

Tableau II.2: Tableau récapitulatif des valeurs de CMC de GdL1, GdL2 et GdL3.

Techniques	GdL1	GdL2	GdL3
Relaxométrie (H ₂ O)	1 mM	-	-
UV-Vis (H ₂ O)	0.015 μ M	0.035 mM	0.005 mM

De plus, on remarque que plus la molécule est amphiphile (son log P est proche de zéro), plus la CMC est influencée par le log P (Tableau II.1). En effet, pour les valeurs de log P autour de zéro, une petite variation de log P entraîne un changement important de la CMC (Figure II.11). Au contraire, entre les complexes GdL2 et GdL3 (log P plus élevé), la différence des CMC est beaucoup moins marquée, malgré une grande différence en log P. Néanmoins, ces conclusions sont tirées des résultats sur un petit nombre de molécules et ne devront pas être surinterprétées.

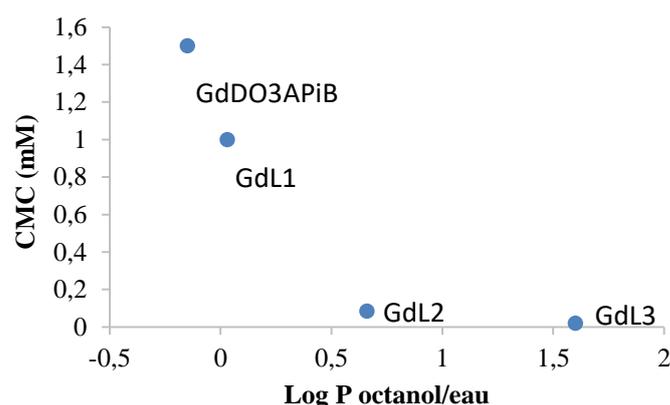


Figure II.11: Représentation du classement des complexes de Gd(III) selon la lipophilie et la CMC, par la technique d'UV-vis dans l'eau.

Les valeurs de CMC ont été précédemment déterminées, surtout par relaxométrie, pour plusieurs complexes de Gd(III). Typiquement, des complexes amphiphiles de type GdDOTA comportant des chaînes alkyles C10 à C14 avaient des CMCs entre 7.2 et 0.86 mM, respectivement, alors que la CMC du dérivé C18 descendait à 0.06 mM²². Les CMCs de GdL2 et GdL3 étant plus basses à cette dernière valeur, nous pouvons conclure que la structure aromatique de l'unité PiB représente une contribution efficace à la promotion de l'agrégation.

Dans la gamme de concentration étudiée, on peut observer plusieurs changements de structure. Ainsi on peut supposer que ces composées adoptent des structures de plus en plus élaborées lorsque la concentration augmente. Il est difficile de savoir si l'état détecté, même

pour les plus faibles concentrations, correspond réellement à des monomères ou il s'agit déjà d'un état agrégé, micellaire. Ceci peut avoir comme conséquence, selon la structure, de rendre la partie PiB plus ou moins accessible et ainsi, d'avoir une forte influence sur la reconnaissance des agrégats des peptides amyloïdes.

Il est à noter d'ailleurs que nous allons continuer d'appeler CMC les concentrations qui représentent les points de rupture dans la variation des paramètres physico-chimiques suivis, même s'il est certain que les différents états agrégés ne sont pas tous des micelles ordinaires.

3.3 Détermination de la taille et de la charge des particules formées dans des solutions de GdL1-3

Selon la concentration, les complexes GdL1-3 peuvent exister en solution sous différentes formes monomérique et agrégées. Les études précédentes ont clairement montré qu'il existe des points de rupture ou des phases de transition entre différents régimes.

Il peut également exister différentes morphologies de micelles. De façon générale, pour une molécule amphiphile, si la partie hydrophile est plus grande que le bloc hydrophobe, il y a formation de particule de type cœur hydrophobe-couronne hydrophyle²³ (Figure II.12).

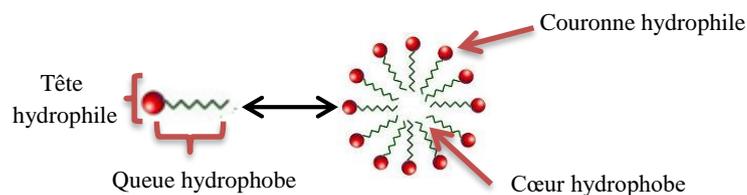


Figure II.12: Forme des micelles

Si le bloc hydrophile est très grand, il n'y a pas de formation de micelles mais seuls des monomères existent en solution. Par contre, dans le cas d'une chaîne hydrophobe longue, la structure sera plutôt de type cylindrique ou lamellaire²⁴ (Figure II.13). Dans le cas de nos complexes, la longueur et la lipophilie de l'espaceur entre la partie hydrophile et la partie hydrophobe sont également des facteurs importants.

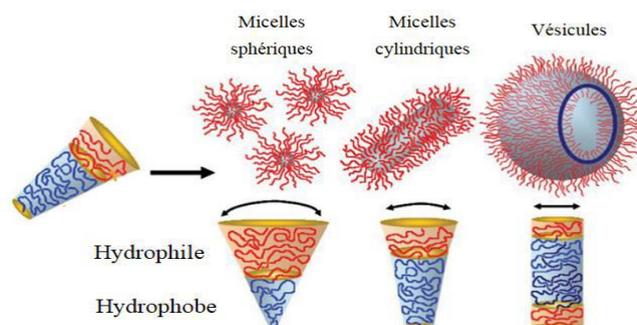


Figure II.13: Différents auto-assemblages de molécules amphiphiles^{25,26} (Edité de Blanazs).

Afin de mieux caractériser les systèmes, les mesures de taille sont nécessaires.

A l'aide d'un Zetasizer, nous avons mesuré la taille des particules formées par nos complexes pour des concentrations de part et d'autre de la CMC. En plus de la détermination des tailles, il est possible de déterminer la charge de surface des particules, à partir du potentiel Zeta. Cette information nous est importante pour prévoir le type d'interaction entre les complexes et les peptides.

3.3.2 Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La DLS est une technique optique qui utilise les chocs continus entre les molécules du liquide qui provoquent un mouvement désordonné et aléatoire des particules connu sous le nom de mouvement Brownien²⁷ comme une « signature » de la taille des particules en suspension par la mesure de leur coefficient de diffusion D donné par l'équation suivante :

$$D = \frac{kT}{3\pi\mu\varnothing H} \quad \text{II.2}$$

Avec :

k : la constante de Boltzmann

T : la température du solvant

μ : la viscosité du milieu

$\varnothing H$: le diamètre hydrodynamique de la particule qui prend en compte le diamètre de la particule et sa couche d'hydratation (Figure II.14).

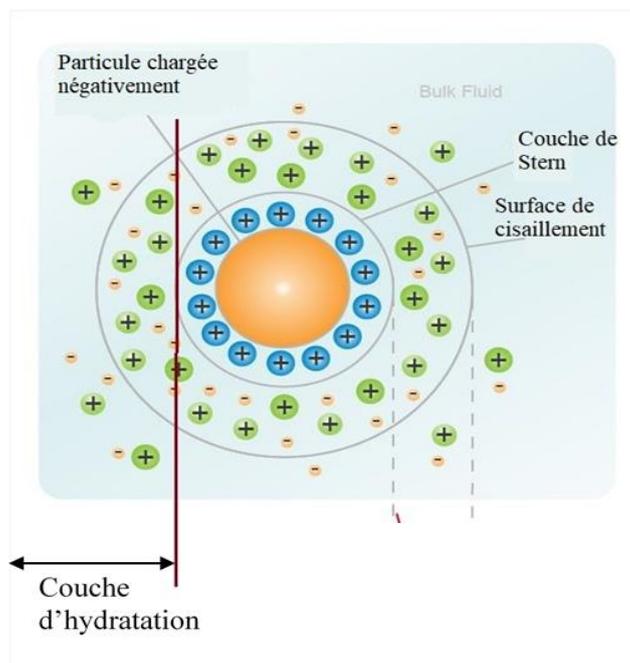


Figure II.14: Représentation d'une particule avec les couches ioniques.

Cette technique très sensible repose sur le comptage des photons collectés après la diffusion de la lumière dans la solution de particules. La largeur de distribution est caractérisée par l'indice de polydispersité PI qui tient compte des populations de tailles des particules différentes dans un échantillon. Un $PI > 0.5$ signifie qu'il existe plusieurs populations dans la solution et les valeurs données sont la moyenne des tailles détectées. En vue des résultats de CMC, nos particules peuvent former différentes populations selon la concentration et le milieu étudiés. L'hypothèse que nous pouvons développer dans ce cas est que chaque population peut avoir une interaction différente avec les peptides amyloïdes et donc ceci finira par influencer l'affinité entre le complexe et le peptide.

3.3.3 Potentiel Zeta

Dans une solution, les particules chargées sont entourées par des contre-ions formant la couche de Stern (Figure II.14). Autour, il existe une couche plus hétérogène et diffuse où le nombre de charges opposées est supérieur au nombre de charges identiques à celle de la particule. Au-delà de cette couche, les ions et les contre-ions sont en équilibre.

Le potentiel Zêta, ou potentiel électrocinétique ψ_z , est par définition le potentiel entre la surface de la particule et le point de l'électroneutralité.

3.3.4 Résultats : taille et charge des particules GdL1-3 :

GdL1 et GdL2 ont été étudiés dans l'eau et dans HBS alors que GdL3 a été étudié uniquement dans HBS (pH 7.4) (Tableau II.3 & II.4) à 37°C.

Tableau II.3: Diamètres et charges des particules déterminées à différentes concentrations de complexes dans l'eau, 37°C.

Complexes	Concentration (μM)	Diamètre (nm)	PI	Charge
GdL1	250	620	1.70	Neutre
	150	550	1.04	
	30	35	1.15	
GdL2	120	450	0.78	Neutre
	20	13	0.53	
	5	5	0.57	

Chapitre II : Complexes avec un bras de ciblage

Les concentrations ont été choisies en se basant sur les différents régimes mis en évidence par les valeurs de CMC. Pour GdL1 et GdL2, les tailles déterminées à haute concentration indiquent la présence des particules très grandes, au moins un ordre de grandeur plus élevées que la taille de micelles typiquement observée pour les complexes de Gd(III) avec une chaîne C12 par exemple, dans l'ordre de quelques nm²⁸. L'indice de PI montre un système complexe et très polydispersé. Nous ne connaissons pas en détails la composition de notre système mais nous pouvons le qualifier d'hétérogène. Même à la plus basse concentration, des particules agrégées semblent exister. Néanmoins, il faut garder en tête que ces données peuvent être aussi le résultat de quelques grosses particules présentes à une concentration très faible et dans plusieurs cas les indices de PI dépassent la valeur de 0.7, qui est en général considérée comme un seuil à partir duquel le système est beaucoup trop polydispersé et n'est pas bien adapté à la technique de DLS²⁹.

Tableau II.4 : Diamètre des particules à différentes concentrations des complexes dans HBS, pH 7.4, 37°C.

Complexes	Concentrations (μM)	Diamètre (nm)	PI	Charge
GdL1	250	3400	0.51	Neutre
	150	1100	0.78	
	30	980	1.15	
GdL2	120	300	1.42	Neutre
	20	14	0.21	
	5	5.0	0.32	
	3	3.6	0.26	
GdL3	200	2700	1.00	Neutre
	60	1100	1.00	
	20	150	1.2	
	3	18	0.62	

Les résultats obtenus semblent être en cohérence avec les différents régimes de structure observés dans les études de détermination de CMC. En solution tamponnée, les tailles sont en moyenne deux fois plus élevées. De plus, une plus grande polydispersité est observée. Ceci

semble être en accord avec un plus grand nombre de régimes d'agrégation détectés (plusieurs valeurs de CMC calculées) par rapport aux solutions dans l'eau pure.

4. Conclusions

Deux ligands macrocycliques L2 et L3, comportant un bras de ciblage PiB ont été synthétisés et des phénomènes d'agrégation ont été étudiés dans des solutions aqueuses de leurs complexes de Gd(III). Le complexe analogue GdL1, précédemment synthétisé, a été utilisé comme composé de référence.

Tout d'abord, la lipophilie des complexes a été caractérisée par leur coefficient de partage, log P. Ces valeurs dépendent à la fois de la longueur de la chaîne qui relie l'unité du dérivé du PiB au complexe métallique et de l'orientation du PiB. Cette dernière va aussi déterminer la fonction chimique qui connecte le PiB à la chaîne hydrophobe (amide ou éther oxygène) et la fonction au bout du PiB (amine ou méthoxy). Comme attendu, les valeurs de log P augmentent dans l'ordre du GdL1 < GdL2 < GdL3 (0,03 ; 0,63 ; 1,46 ; respectivement), correspondant à une lipophilie croissante.

Les complexes sont des molécules amphiphiles et forment des agrégats en solution aqueuse. La micellisation a été suivie par relaxométrie, et par spectroscopies UV-vis et par fluorescence. L'agrégation résulte en effet dans un changement de propriétés de relaxation et de propriétés optiques à des concentrations précises que nous avons associé à un changement de structure en solution. L'étude de la CMC par la fluorescence n'a pas été prise en compte dans ce qui suit puisqu'à des concentrations importantes, nous avons fait face à l'effet de filtre interne. Ce phénomène fausse énormément les résultats et il n'est pas possible de tirer des conclusions claires. Malgré cela, la relaxométrie et l'UV-visible ont permis d'étudier des gammes de concentrations différentes, mais globalement, quand il est possible de couvrir une même gamme de concentration, on détecte des changements de structure à peu près aux mêmes concentrations, indépendamment de la technique utilisée.

Les mesures de taille indiquent que même à basses concentrations, où la présence des seuls monomères aurait pu être attendue, il existe des particules de taille importante. Néanmoins, il reste difficile à estimer quelle proportion ces grosses particules réellement représentent et les grandes valeurs des indices de polydispersité suggèrent que ces systèmes ne sont pas bien adaptés aux mesures DLS.

Chapitre II : Complexes avec un bras de ciblage

Enfin, les valeurs de la CMC ont pu être reliées aux valeurs de $\log P$. Plus le $\log P$ est élevé, plus la CMC est basse ; néanmoins, pour les molécules très hydrophobes, la CMC dépend moins du $\log P$.

5. Bibliographie

- (1) Martins, A. F. Multimodal Imaging Probes for the Diagnostics of Alzheimer's Disease. **2013**.
- (2) Cressier, D.; Dhilly, M.; Cao Pham, T. T.; Fillesoye, F.; Gourand, F.; Maïza, A.; Martins, A. F.; Morfin, J.-F.; Geraldès, C. F. G. C.; Tóth, É.; Barré, L. Gallium-68 Complexes Conjugated to Pittsburgh Compound B: Radiolabeling and Biological Evaluation. *Molecular Imaging and Biology* **2016**, *18* (3), 334–343. <https://doi.org/10.1007/s11307-015-0906-9>.
- (3) Brücher, E. Kinetic Stabilities of Gadolinium(III) Chelates Used as MRI Contrast Agents. In *Contrast Agents I: Magnetic Resonance Imaging*; Krause, W., Ed.; Topics in Current Chemistry; Springer: Berlin, Heidelberg, 2002; pp 103–122. https://doi.org/10.1007/3-540-45733-X_4.
- (4) Ermini, M. L.; Chadtová Song, X.; Špringer, T.; Homola, J. Peptide Functionalization of Gold Nanoparticles for the Detection of Carcinoembryonic Antigen in Blood Plasma via SPR-Based Biosensor. *Front. Chem.* **2019**, *7*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00040>.
- (5) Song, J.; Peng, X.; Li, L.; Yang, F.; Zhang, X.; Zhang, J.; Dai, J.; Cui, M. Al18F-NODA Benzothiazole Derivatives as Imaging Agents for Cerebrovascular Amyloid in Cerebral Amyloid Angiopathy. *ACS Omega* **2018**, *3* (10), 13089–13096. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01120>.
- (6) Cui, M.; Wang, X.; Yu, P.; Zhang, J.; Li, Z.; Zhang, X.; Yang, Y.; Ono, M.; Jia, H.; Saji, H.; Liu, B. Synthesis and Evaluation of Novel ¹⁸F Labeled 2-Pyridinylbenzoxazole and 2-Pyridinylbenzothiazole Derivatives as Ligands for Positron Emission Tomography (PET) Imaging of β -Amyloid Plaques. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (21), 9283–9296. <https://doi.org/10.1021/jm300973k>.
- (7) Bunescu, A. Photo-et Biodégradation de Dérivés Du Benzothiazole: Étude En Système Combiné. 214.
- (8) Waterhouse, R. N. Determination of Lipophilicity and Its Use as a Predictor of Blood–Brain Barrier Penetration of Molecular Imaging Agents. *Molecular Imaging & Biology* **2003**, *5* (6), 376–389. <https://doi.org/10.1016/j.mibio.2003.09.014>.
- (9) Mathis, C. A.; Bacskai, B. J.; Kajdasz, S. T.; McLellan, M. E.; Frosch, M. P.; Hyman, B. T.; Holt, D. P.; Wang, Y.; Huang, G.-F.; Debnath, M. L.; Klunk, W. E. A Lipophilic Thioflavin-T Derivative for Positron Emission Tomography (PET) Imaging of Amyloid in Brain. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2002**, *12* (3), 295–298. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)00734-X](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)00734-X).
- (10) Martins, A. F.; Morfin, J.-F.; Geraldès, C. F. G. C.; Tóth, É. Gd³⁺ Complexes Conjugated to Pittsburgh Compound B: Potential MRI Markers of β -Amyloid Plaques. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2014**, *19* (2), 281–295. <https://doi.org/10.1007/s00775-013-1055-8>.
- (11) Martins, A. F.; Morfin, J.-F.; Kubíčková, A.; Kubíček, V.; Buron, F.; Suzenet, F.; Salerno, M.; Lazar, A. N.; Duyckaerts, C.; Arlicot, N.; Guilloteau, D.; Geraldès, C. F. G. C.; Tóth, É. PiB-Conjugated, Metal-Based Imaging Probes: Multimodal Approaches for the Visualization of β -Amyloid Plaques. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4* (5), 436–440. <https://doi.org/10.1021/ml400042w>.
- (12) Martins, A. F.; Dias, D. M.; Morfin, J.-F.; Lacerda, S.; Laurents, D. V.; Tóth, É.; Geraldès, C. F. G. C. Interaction of PiB-Derivative Metal Complexes with Beta-Amyloid Peptides: Selective Recognition of the Aggregated Forms. *Chemistry - A European Journal* **2015**, *21* (14), 5413–5422. <https://doi.org/10.1002/chem.201406152>.
- (13) Mathis, C. A.; Wang, Y.; Holt, D. P.; Huang, G.-F.; Debnath, M. L.; Klunk, W. E. Synthesis and Evaluation of ¹¹C-Labeled 6-Substituted 2-Arylbenzothiazoles as Amyloid Imaging Agents. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (13), 2740–2754. <https://doi.org/10.1021/jm030026b>.
- (14) Costa, P. M.; Wang, J. T.-W.; Morfin, J.-F.; Khanum, T.; To, W.; Sosabowski, J.; Tóth, E.; Al-Jamal, K. T. Functionalised Carbon Nanotubes Enhance Brain Delivery of Amyloid-Targeting Pittsburgh Compound B (PiB)-Derived Ligands. *Nanotheranostics* **2018**, *2* (2), 168–183. <https://doi.org/10.7150/ntno.23125>.

- (15) Molavipordanjani, S.; Emami, S.; Mardanshahi, A.; Talebpour Amiri, F.; Noaparast, Z.; Hosseinimehr, S. J. Novel ^{99m}Tc -2-Arylimidazo[2,1-b]Benzothiazole Derivatives as SPECT Imaging Agents for Amyloid- β Plaques. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *175*, 149–161. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.04.069>.
- (16) Lin, K.-S.; Debnath, M. L.; Mathis, C. A.; Klunk, W. E. Synthesis and β -Amyloid Binding Properties of Rhenium 2-Phenylbenzothiazoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *19* (8), 2258–2262. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.02.096>.
- (17) Mathis, C.; Wang, Y.; Klunk, W. Imaging β -Amyloid Plaques and Neurofibrillary Tangles in the Aging Human Brain. *CPD* **2004**, *10* (13), 1469–1492. <https://doi.org/10.2174/1381612043384772>.
- (18) Wang, Y.; Mathis, C. A.; Huang, G.-F.; Debnath, M. L.; Holt, D. P.; Shao, L.; Klunk, W. E. Effects of Lipophilicity on the Affinity and Nonspecific Binding of Iodinated Benzothiazole Derivatives. *JMN* **2003**, *20* (3), 255–260. <https://doi.org/10.1385/JMN:20:3:255>.
- (19) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *46* (1), 3–26. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0). The Article Was Originally Published in *Advanced Drug Delivery Reviews* **23** (1997) 3–25.
- (20) Torchilin, V. P. Micellar Nanocarriers: Pharmaceutical Perspectives. *Pharmaceutical Research* **2006**, *24* (1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9132-0>.
- (21) Martins, A. F.; Oliveira, A. C.; Morfin, J.-F.; Laurents, D. V.; Tóth, É.; Geraldés, C. F. G. C. Associating a Negatively Charged GdDOTA-Derivative to the Pittsburgh Compound B for Targeting $\text{A}\beta$ Amyloid Aggregates. *J Biol Inorg Chem* **2016**, *21* (1), 83–99. <https://doi.org/10.1007/s00775-015-1316-9>.
- (22) Nicolle, G. M.; Tóth, É.; Eisenwiener, K.-P.; Mäcke, H. R.; Merbach, A. E. From Monomers to Micelles: Investigation of the Parameters Influencing Proton Relaxivity. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2002**, *7* (7–8), 757–769. <https://doi.org/10.1007/s00775-002-0353-3>.
- (23) Trubetskoy, V. Polymeric Micelles as Carriers of Diagnostic Agents. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1999**, *37* (1–3), 81–88. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00100-8](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00100-8).
- (24) Zhang, L.; Eisenberg, A. Multiple Morphologies of “Crew-Cut” Aggregates of Polystyrene-*b*-Poly(Acrylic Acid) Block Copolymers. *Science* **1995**, *268* (5218), 1728–1731. <https://doi.org/10.1126/science.268.5218.1728>.
- (25) Blanazs, A.; Armes, S. P.; Ryan, A. J. Self-Assembled Block Copolymer Aggregates: From Micelles to Vesicles and Their Biological Applications. *Macromolecular Rapid Communications* **2009**, *30* (4–5), 267–277. <https://doi.org/10.1002/marc.200800713>.
- (26) Letchford, K.; Burt, H. A Review of the Formation and Classification of Amphiphilic Block Copolymer Nanoparticulate Structures: Micelles, Nanospheres, Nanocapsules and Polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2007**, *65* (3), 259–269. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.11.009>.
- (27) Hoffmann, M.; Wagner, C. S.; Harnau, L.; Wittemann, A. 3D Brownian Diffusion of Submicron-Sized Particle Clusters. *ACS Nano* **2009**, *3* (10), 3326–3334. <https://doi.org/10.1021/nn900902b>.
- (28) Lacerda, S.; Bonnet, C. S.; Pallier, A.; Villette, S.; Foucher, F.; Westall, F.; Buron, F.; Suzenet, F.; Pichon, C.; Petoud, S.; Tóth, É. Lanthanide-Based, Near-Infrared Luminescent and Magnetic Lipoparticles: Monitoring Particle Integrity. *Small* **2013**, *9* (16), 2662–2666. <https://doi.org/10.1002/sml.201201923>.
- (29) Dynamic Light Scattering Common Terms Defined.

Chapitre III : Complexes avec un bras de ciblage - Etudes des interactions avec des peptides amyloïdes

1. Introduction

Suite aux résultats obtenus et discutés dans le chapitre précédent, nous allons nous focaliser sur l'interaction entre les complexes et les peptides amyloïdes de type A β ₁₋₄₀ et amyline. Dans un premier temps, nous déterminerons les affinités (constantes de dissociation K_D), puis dans un deuxième temps, nous analyserons l'influence des complexes sur le processus d'agrégation.

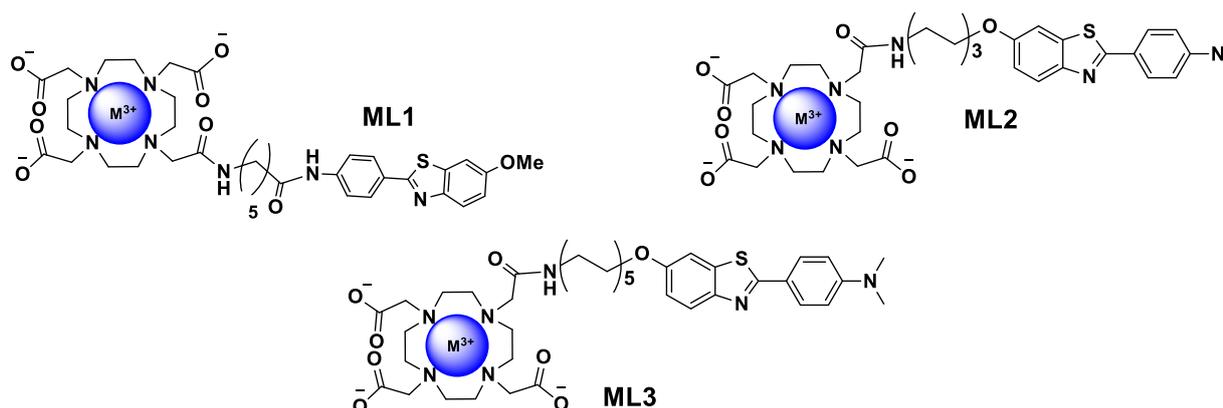


Figure III.1: Structures des complexes ML1-3

2. Etude de l'affinité des GdL1-3 aux peptides amyloïdes et à la HSA

Les peptides amyloïdes font l'objet principal de notre étude, mais l'affinité des complexes à l'albumine sérique humaine (Human Serum Albumin – HSA - en anglais) est également importante. En effet, la HSA est la protéine la plus abondante dans le plasma. Elle a la capacité de lier des molécules de structures très différentes et ainsi modifier leurs propriétés pharmacocinétiques, à savoir la solubilité, la métabolisation et la biodistribution¹.

Parmi les différentes techniques expérimentales qui permettent d'étudier l'interaction entre une biomolécule et un ligand, nous avons utilisé la Résonance Plasmon de Surface (SPR) afin de déterminer les constantes d'affinité des agents de contraste vis-à-vis de l'A β ₁₋₄₀, de l'amyline et de la HSA.

2.1 Principe de la Résonance Plasmon de Surface (SPR)

La SPR (Surface Plasmon Resonance) est basée sur une méthode optique de mesure de l'indice de réfraction proche de la surface de la sensorchip. Lorsqu'on rajoute une couche mince d'un matériau conducteur (or) entre les deux milieux, une partie de la lumière réfractée

est transformée en champ électrique qui se propage sur la couche d'or en contact avec le milieu du plus faible indice de réfraction (eau). La profondeur de cette propagation dans le milieu de faible indice de réfraction est de l'ordre de quelques centaines de nanomètre. Tous changement de concentration à ce niveau agira sur l'indice de réfraction donc sur l'angle de la lumière réfractée ce qui peut être mesuré comme réponse SPR (Figure III.2).

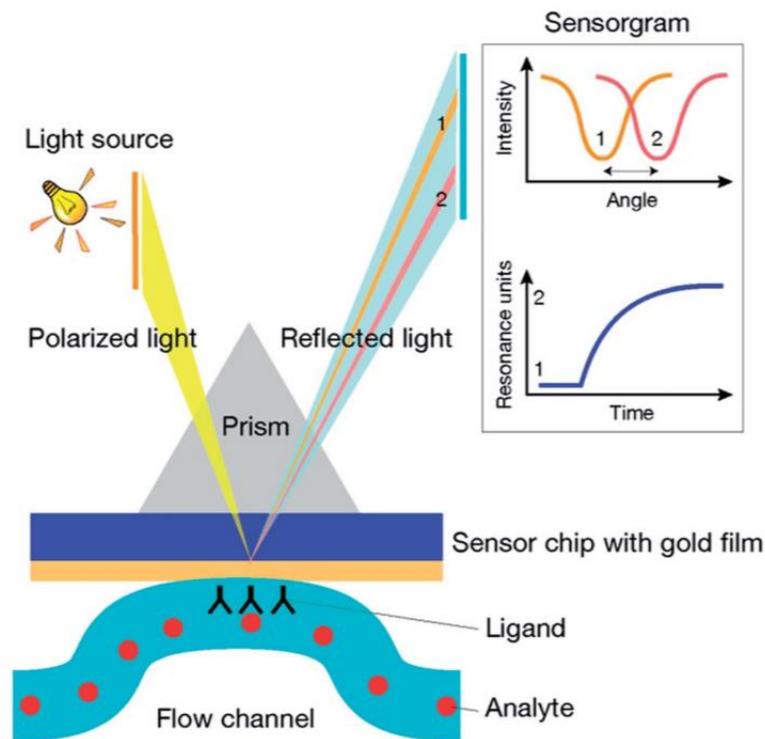


Figure III.2: Les bases de la technique de Résonance Plasmon de Surface ².

L'interaction entre un ligand L (la molécule immobilisée) et un analyte A (la molécule injectée) est traduite par une augmentation de l'indice de réfraction au cours du temps.



Les courbes de la réponse en unité de résonance RU en fonction du temps sont appelés sensorgrammes (Figure III.3). 1000 RU de réponse lors de l'immobilisation est équivalent à 1pgmm^{-2} de ligand immobilisé³.

Plusieurs expériences à différentes concentrations de l'analyte sont nécessaires pour pouvoir déterminer une constante d'affinité de l'analyte vis-à-vis du ligand en question.

Une sensorchip est considérée comme étant le cœur de la technologie de SPR, puisque les biomolécules sont immobilisées dessus grâce à la surface activée du dextran (fonction carboxyles ou amine ou des fonctions greffées...) et interagissent avec l'analyte. Afin de

soustraire les interactions non spécifiques, une des voies du sensorchip est utilisée comme voie de référence. Elle subit le même traitement de départ mais sans immobilisation du ligand, donc le passage de la molécule injectée n'entraîne pas d'interaction spécifique.

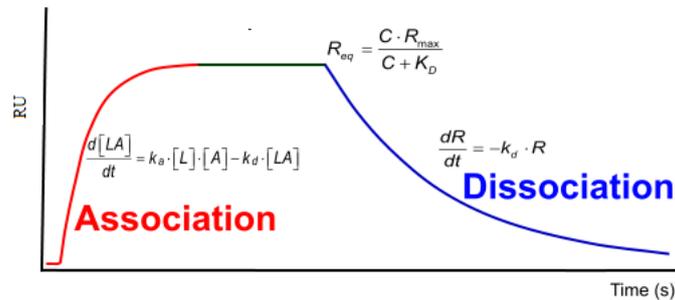


Figure III.3: Exemple de sensorgramme et les équations de chaque phase.

L'utilisation de cette technique nous permet d'éviter les soucis liés aux différents états d'agrégation possibles des peptides au moment des expériences, puisque ces derniers pourront être immobilisés sur une sensorchip dans un état d'agrégation contrôlé, par des liaisons covalentes. Cela demande une préparation particulière des sensorchips, puisque nous sommes dans l'obligation d'induire la formation des fibrilles même après l'immobilisation. Wonseok Lee *et al.* ont établi un protocole pour immobiliser des agrégats de peptides amyloïdes⁴ sur une chip de type CM5⁵. Le bon contrôle d'agrégation obtenu par cette méthodologie a été confirmé par microscopie. Nous avons ainsi suivi ce mode opératoire pour immobiliser les peptides amyloïdes A β ₁₋₄₀ et amyline (voir les détails dans le chapitre V : La partie expérimentale).

De façon générale, il est recommandé d'immobiliser le ligand à des niveaux minimums pour ! éviter les effets stériques et les interactions entre les molécules immobilisées et ainsi minimiser le phénomène de limitations par transfert de masse ainsi que les interactions non-spécifiques. Néanmoins, nos complexes ont des poids moléculaires faibles comparé aux agrégats de peptides qui sont immobilisés sur les sensorchips. Par conséquent, les interactions entre les peptides et les complexes représentent une faible augmentation de masse, donc un faible signal. Alors afin de maximiser la réponse SPR détectable après l'interaction entre les complexes et les peptides et pour obtenir un signal mesurable, il a été nécessaire d'immobiliser le maximum possible de peptides sur les sensorchips. Ce fort taux d'immobilisation est particulièrement important dans le cas de la HSA qui a une masse moléculaire très élevée, de 66.5 kDa.

2.2 SPR : Modèle de Langmuir

Dans l'analyse des résultats obtenus, le modèle de Langmuir est le plus utilisé pour la détermination des constantes de dissociation (K_D). Selon le modèle Langmuir, l'analyte (le complexe dans notre cas) se lie au ligand (le peptide agrégé) de façon monovalente, le peptide est homogène et les sites d'interaction sont équivalents et indépendants. Dans ce cas-là, l'isotherme d'interaction de Langmuir est décrite comme suit:

$$R_{eq} = \frac{C^A * R_{Max}}{C^A + K_D} \quad \text{III.1}$$

Avec :

R_{eq} : RU à l'équilibre pour une concentration d'analyte donnée

R_{Max} : La réponse maximale en RU

C^A : La concentration injectée du complexe (M)

K_D : Constante de dissociation

Dans un premier temps, toutes les expériences SPR ont été traitées par le modèle de Langmuir, qui nous a permis la détermination d'une constante de dissociation pour chacun des systèmes étudiés. Dans l'équipe, des tests ont été faits auparavant avec des complexes similaires et il a été conclu que ce type de complexes n'interagit pas avec la forme monomérique des peptides⁶.

2.3 Résultats

Dans le cas des trois complexes de Gd(III), nous avons commencé avec une gamme de concentration de l'ordre du millimolaire allant jusqu'à des concentrations nanomolaires quand les mesures le permettaient. Ces concentrations ont été testé sur deux sensorchips CM5, où nous avons immobilisé les peptides $A\beta_{1-40}$ et amyline avec un niveau d'immobilisation d'environ 4000 RU. Dans le cas de la HSA, compte tenu de la grande différence de masse molaire entre nos complexes et la protéine, le niveau d'immobilisation a été porté à 11000 RU, ce qui est suffisant pour obtenir un bon signal⁷. Ici, sont représentés les exemples de fit selon le modèle de Langmuir 1:1 représentant l'interaction du complexe GdL2 avec les peptides étudiés et la HSA (Figure III.4), les données expérimentales et les fit réalisés pour les autres complexes étant regroupés en **annexe 1**.

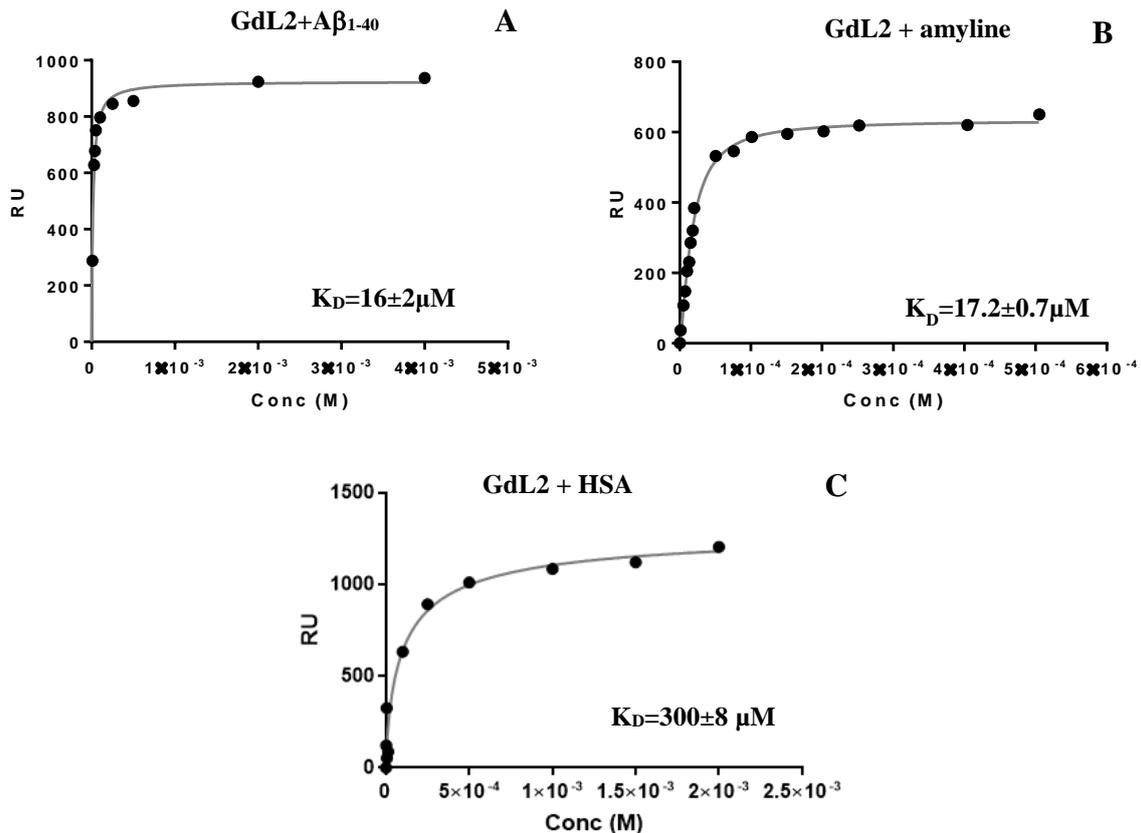


Figure III.4: Représentation de Langmuir 1:1 exprimant une interaction de GdL2 avec l'Aβ₁₋₄₀ (A), l'amyline (B) pour un niveau d'immobilisation=4000RU, et la HSA (niveau d'immobilisation=11000RU) (C), à pH 7.4, 37°C.

Les constantes de dissociation K_D des complexes GdL1-3 pour les agrégats des peptides Aβ₁₋₄₀ et amyline (niveau d'immobilisation de 4000RU) ainsi que pour la HSA (niveau d'immobilisation de 11000RU) sont regroupées dans le tableau III.1.

Tableau III.1: Constantes de dissociation, K_D , correspondantes aux interactions des complexes GdL1-3 avec les peptides (Aβ₁₋₄₀, amyline) et la HSA.

Complexes	Aβ ₁₋₄₀	Amyline	HSA
GdL1	71.0±9.0μM	8.3±0.9μM	1700.0±300.0μM
GdL2	16.0±2.0μM	17.2±0.7μM	300.0±8.0μM
GdL3	5.1±0.2μM	3.7±0.9μM	36.0±7.0μM

Premièrement, on remarque que les constantes de dissociation entre les deux peptides amyloïdes pour un même complexe sont très proches. Les résultats pour GdL2 sont de l'ordre de 20μM, entre 8 et 70μM pour GdL1 et 5 μM pour GdL3. Aucun de ces composés ne montre une quelconque sélectivité pour l'un des peptides.

Chapitre III : Complexes avec un bras de ciblage

Tous les K_D sont compris entre 3 et $72\mu\text{M}$, donc les différences de structure entre ces trois complexes ont peu d'influence sur leur affinité aux peptides. On peut tout de même établir un ordre du plus affiné au moins affiné :

$$\text{Amylin} : \text{GdL3} > \text{GdL2} > \text{GdL1}$$

$$\text{A}\beta_{1-40} : \text{GdL3} > \text{GdL1} > \text{GdL2}$$

Pour la HSA, les résultats montrent des affinités modérées dans le cas de GdL1 et GdL2 (K_D de 1.7 et 0.3 mM) tandis que le complexe GdL3 est plus affiné à la HSA avec un K_D de $36\mu\text{M}$. Ces résultats ne sont pas surprenants car il est connu que les molécules hydrophobes possèdent une meilleure affinité pour la HSA. Ainsi, la diminution des K_D observés est en adéquation avec les coefficients de partition octanol/eau des complexes.

Il est important que les sondes ne montrent pas de fortes affinités pour la HSA comparées à celles envers les peptides amyloïdes. Néanmoins, une affinité plus modérée mais suffisante pour la HSA peut permettre à ces sondes de rester plus longtemps dans la circulation, une fois injectées dans le sang, et ainsi d'avoir plus de temps pour atteindre la cible pour laquelle elles ont plus d'affinité.

Dans le but d'explorer les interactions potentielles aux plus faibles concentrations, nous avons cherché à augmenter encore plus le niveau d'immobilisation des peptides amyloïdes sur les sensorchips. Nous avons ainsi obtenu un niveau d'immobilisation d'environ 9100 RU pour les deux peptides, plus que le double de celui des expériences précédentes (~ 4000 RU).

Dans ces conditions, pour les complexes GdL1 et GdL2, nous n'avons pas pu observer d'interactions supplémentaires, confirmant ainsi les résultats obtenus à un niveau d'immobilisation plus faible (**Annexe1** Figure III.1 & Figure III.3). Les constantes de dissociation restent du même ordre de grandeur même si on remarque une légère diminution des K_D avec GdL1 (respectivement $K_D = 48 \pm 26\mu\text{M}$ et $1.9 \pm 0.5\mu\text{M}$ pour $\text{A}\beta_{1-40}$ et amyline) et une légère augmentation avec GdL2 (respectivement $K_D = 48 \pm 9\mu\text{M}$ et $38 \pm 6\mu\text{M}$ pour $\text{A}\beta_{1-40}$ et amyline). Cependant, avec le complexe GdL3, il a été possible de détecter une interaction supplémentaire à des concentrations nanomolaires et ce, pour les deux peptides. Les fits selon le modèle de Langmuir 1 :1 de ces expériences sont représentés sur la figure III.5.

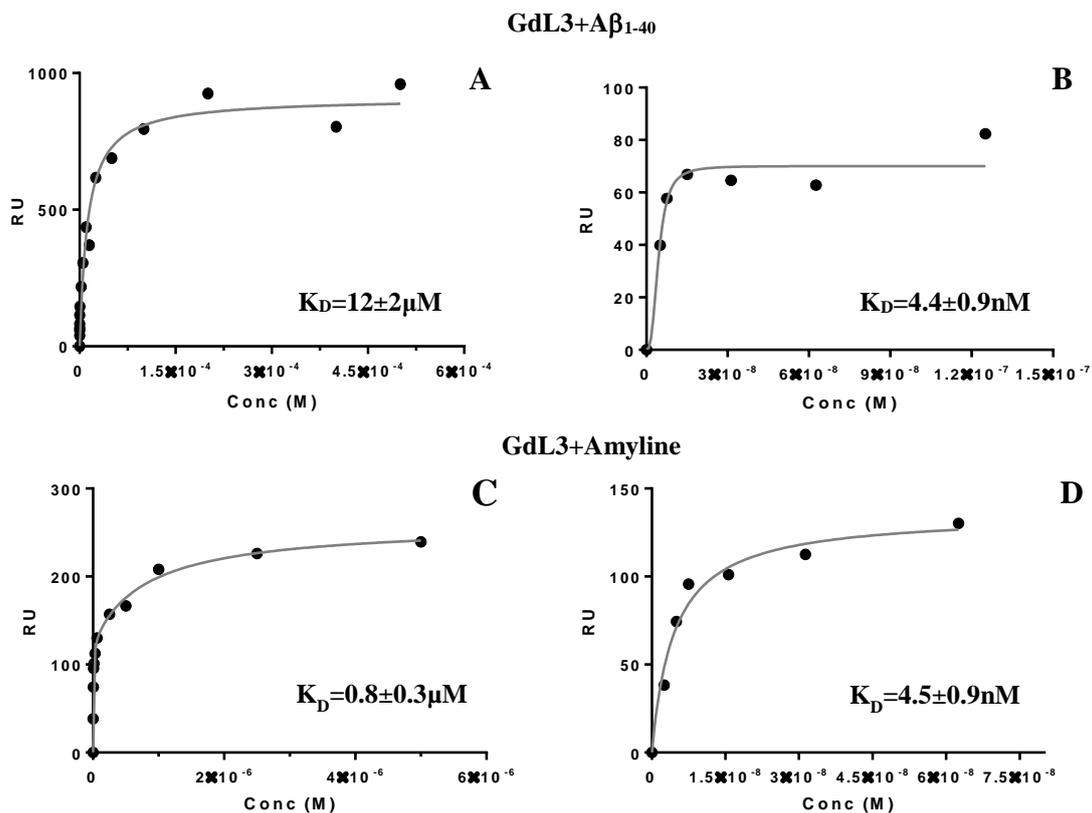


Figure III.5: Représentation de Langmuir 1:1 exprimant les interactions de GdL3 avec l'Aβ₁₋₄₀ dans le cas de solutions micromolaires (A) et nanomolaires (B), et les interactions avec l'amyline dans le cas de solutions micromolaires (C) et nanomolaires (D), pour une immobilisation de 9000RU à pH 7.4, 37°C.

Les constantes de dissociation obtenues en utilisant l'ensemble des données couvrant toutes les concentrations sont légèrement plus petites que celles calculées dans les expériences précédentes (immobilisation plus faible), mais elles restent du même ordre de grandeur (μM). Néanmoins, la différence notable est qu'il est possible de déterminer un deuxième K_D de ~4.5nM (Tableau III.2), dans le cas des deux peptides. En isolant et analysant les données obtenues uniquement pour les plus faibles concentrations de GdL3 (Tableau III.2) des constantes de dissociations K_D de l'ordre du nanomolaire ont été déterminées. Celles-ci montrent une très forte affinité, comparable à celle du PiB, du seul complexe GdL3 aux peptides amyloïdes,

Tableau III.2: Constantes de dissociation, K_D , correspondantes aux interactions du complexe GdL3 avec les peptides (Aβ₁₋₄₀, amyline) à des concentrations nanomolaires.

	Aβ ₁₋₄₀	Amyline
GdL3	De 0 à 125nM $K_D=4.4\pm0.9\text{nM}$	De 0 à 62.5nM $K_D=4.5\pm0.9\text{nM}$

C'est un résultat tout à fait remarquable car c'est la première fois qu'un complexe de Gd(III) montre une affinité aussi importante ; on peut conclure alors que l'allongement du linker entre le PiB et le complexe est bénéfique pour assurer une interaction forte avec les peptides. Les K_D précédemment déterminées en SPR pour les complexes de Gd(III) analogues comportant un dérivé du PiB étaient entre 67-160 μM ⁶ (interaction avec $A\beta_{1-40}$), mais la comparaison est compliquée car dans cette étude, la préparation des chips était différente et notamment l'état d'agrégation du peptide sur les chips n'était pas bien maîtrisé.

Ferroud *et al.*⁸ ont étudié l'affinité à $A\beta_{1-42}$ de nombreux complexes de Gd(III) à base de DOTA ou PCTA conjugués à des unités de ciblage différentes (2-arylbenzothiazole, 2-arylbenzoxazole et stilbene) via différents espaceurs (neutres, chargés positivement ou négativement, et de longueurs différentes). Les K_i ont été déterminés par compétition en utilisant la molécule radiomarquée [¹²⁵I]IMPY ([¹²⁵I]6-iodo-2-(40-diméthylamino)-phenylimidazo[1,2-a]pyridine). Cette technique donne également accès à une gamme de concentration très basse et donc à des affinités potentiellement élevées. Néanmoins, les K_i varient entre 220 nM pour les dérivés PCTA qui ont la meilleure affinité et >1000 nM pour les dérivés DOTA, donc correspondent à des affinités bien inférieures à celle obtenue pour GdL3. Cette différence peut être probablement expliquée par la différence dans les structures moléculaires ; en effet, tous les complexes reportés par Ferroud *et al.* contiennent des linkers plus courts qui n'éloignent visiblement pas assez l'unité de reconnaissance du peptide du complexe métallique comme c'est le cas pour le GdL3.

En ce qui concerne l'interaction entre l'amyline et des complexes métalliques, l'affinité a été récemment étudiée pour deux complexes de ^{99m}Tc comportant de la pyridyl-benzofurane comme unité de reconnaissance⁹, attachée par un espaceur de triéthylène glycol aux complexes. Ici aussi, une étude de compétition a été menée entre l'analogue Re du complexe et la pyridyl-benzofurane radiomarquée au ¹²⁵I, [¹²⁵I]IPBF, pour déterminer les K_i . Le complexe le plus affiné à l'amyline avait un K_i de 146 nM, 2 ordres de grandeur plus élevé que le K_i de IPBF (2.66 nM), ce qui montre une perte d'affinité importante suite à l'attachement d'un complexe métallique à l'unité de ciblage. Ici l'espaceur a à peu près la même longueur (9 atomes) que dans le cas du GdL3 (10 atomes), donc le complexe métallique est bien espacé de l'unité de reconnaissance du peptide, mais la chaîne PEG est plus hydrophile que la chaîne alkyle du GdL3 et cela semble contribuer à une diminution de l'affinité.

Les résultats de notre étude permettent d'accéder à de très basses concentrations du complexe et montrent que le modèle Langmuir, qui suppose une seule interaction 1:1, ne décrit pas toujours correctement la réalité dans la gamme totale des concentrations. C'est pourquoi une analyse plus fine des données expérimentales selon le modèle de Scatchard peut être nécessaire et peut apporter des informations supplémentaires.

2.4 Linéarisation du modèle de Langmuir (représentation de Scatchard)

Les résultats obtenus avec le modèle de Langmuir dans une grande gamme de concentration ont indiqué que l'interaction entre les GdL1-3 et les peptides est plus complexe. Si plusieurs types d'interactions existent, ils peuvent être mis en évidence en utilisant le modèle de Scatchard (Figure III.6). Ce modèle consiste en une analyse graphique simple des données décrivant l'interaction entre un ligand immobilisé et un analyte en solution qui permet également de déterminer des constantes de dissociation, K_D .

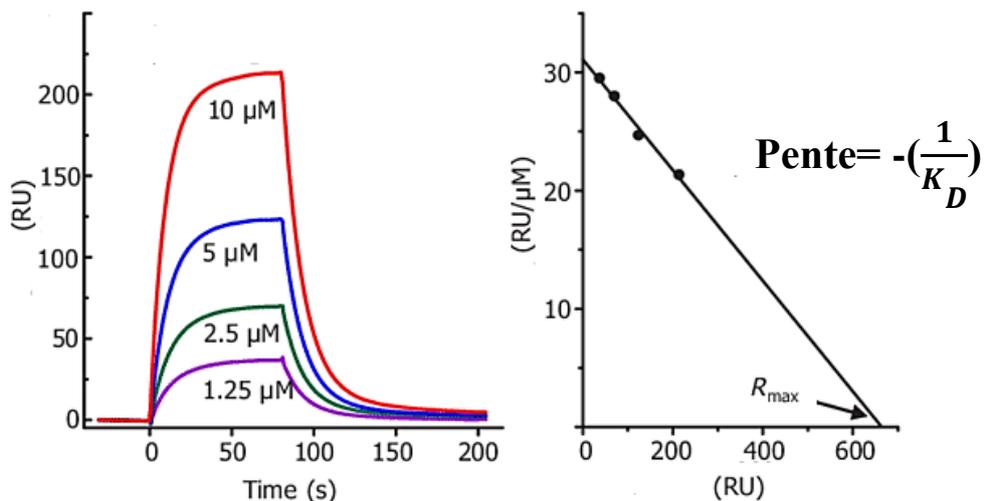


Figure III.6: Linéarisation du modèle de Langmuir : représentation de Scatchard.

Selon le modèle de Scatchard, on représente la réponse maximale en RU divisée par la concentration en fonction de la réponse maximale en RU, qui donne une droite. Les K_D sont alors déterminées à partir de la pente qui a une valeur égale à $-\frac{1}{K_D}$.

i. Cas de l'amyline

Nous avons ré-analysé par la suite toutes les données (les trois complexes en présence des deux peptides et de la HSA) selon le modèle Scatchard. Ici, nous présentons uniquement les résultats obtenus pour l'amyline avec les complexes GdL1, GdL2 et GdL3, tous les autres résultats se trouvent dans l'**annexe2**.

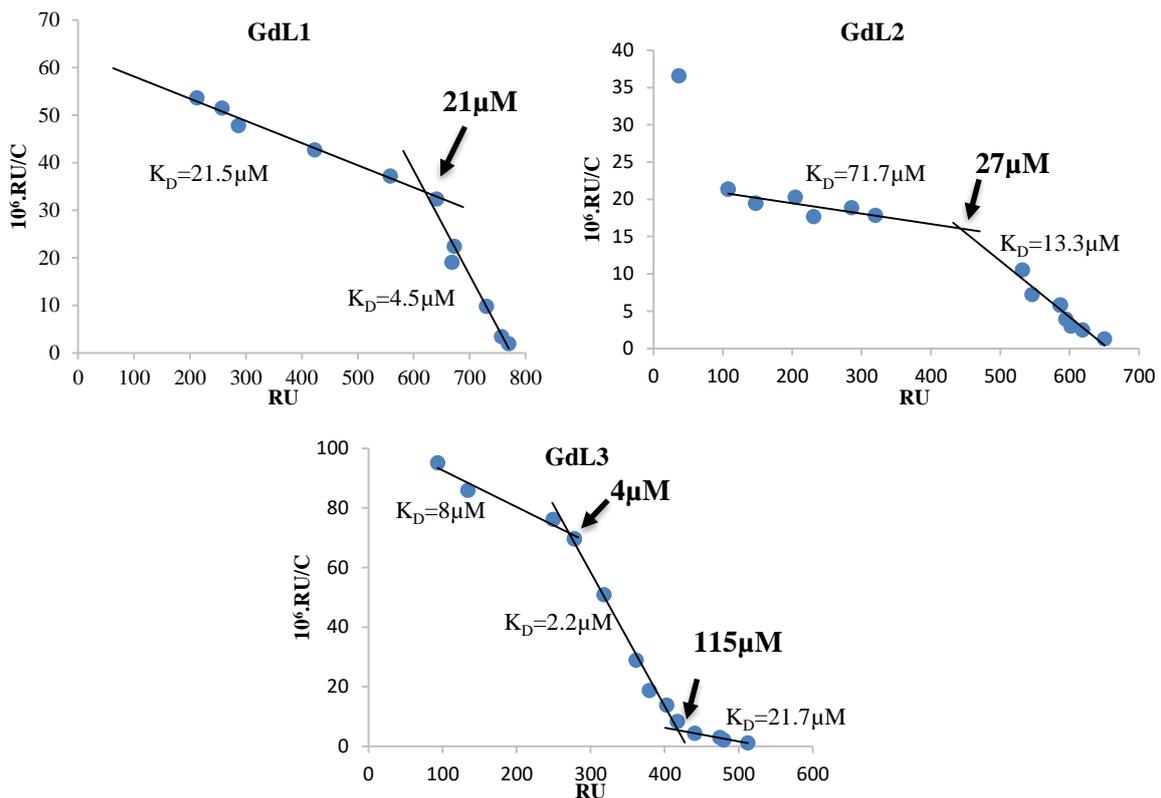


Figure III.7: Représentation Scatchard de l'interaction des complexes GdL1-3 avec l'amyline, pour un niveau d'immobilisation de 4000 RU à pH 7.4, 37°C. Les concentrations indiquées sur les courbes correspondent aux points de rupture.

Nous pouvons constater dans chacun des cas que cette représentation ne donne pas une seule droite comme ce serait attendu, mais plusieurs, et que ces droites correspondent à des pentes, par conséquent à des constantes de dissociation différentes (Figure III.7). Les courbes de tendance tracées ont un facteur de régression ~0.9.

Afin de mieux comprendre les raisons de ce résultat, il est très intéressant à remarquer que les concentrations correspondantes aux ruptures de pentes sont de même ordre de grandeur que les valeurs de CMC, même si on ne trouve pas une correspondance parfaite pour chacune des valeurs (Tableau III.2). Ceci implique que les différents régimes que nous avons pu identifier dans le chapitre précédent en fonction de la concentration, qui sont caractérisés par des structures différentes (monomères, diverses formes d'agrégat), présentent également des affinités différentes aux peptides.

Tableau III.3: Comparaison entre les CMCs et les concentrations correspondantes aux ruptures de pente dans les modèles Scatchard pour GdL1-3 (4000RU)

Complexes	CMC par UV-vis	Concentrations de ruptures de pentes observées		
		A β ₁₋₄₀	Amyline	HSA
GdL1	0.013±0.003 mM	-	0.021 mM	-
GdL2	0.030±0.010 mM	0.027 mM	0.027 mM	0.100 mM
GdL3	0.005±0.001 mM	0.006 mM 0.098 mM	0.004 mM 0.115 mM	0.148 mM

Pour des concentrations inférieures à 5 μ M et à une immobilisation de 9000RU de peptide, nous avons aussi tracé la représentation Scatchard caractérisant l'interaction entre GdL3 et l'amyline (Figure III.8).

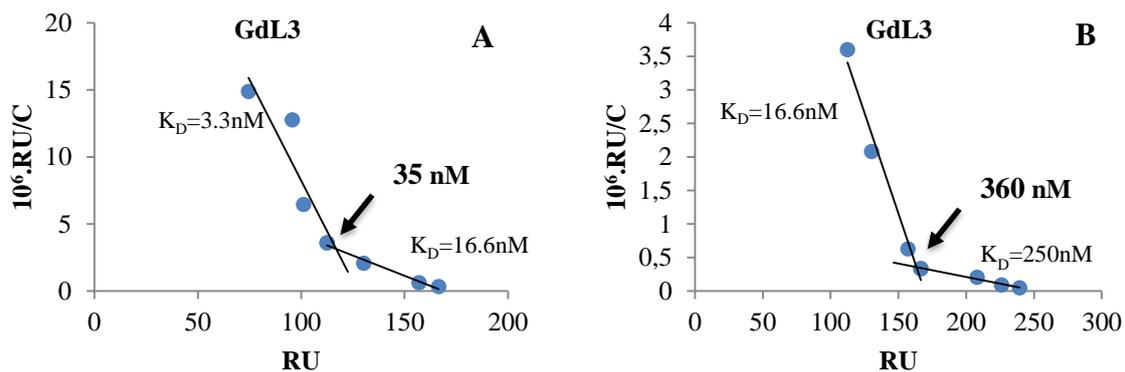


Figure III.8: Représentation Scatchard de l'interaction de GdL3 avec l'amyline, pour une concentration de complexe de 2.5nM à 500nM (A), et de 30nM à 5 μ M (B) pour un niveau d'immobilisation de 9000RU à pH 7.4, 37°C.

On constate que, même à ces faibles concentrations, nous n'obtenons pas une seule représentation linéaire. Comme précédemment, il y a une succession de deux droites qui représentent deux types d'interaction. Néanmoins, on peut supposer que la droite obtenue pour les concentrations inférieures à 35nM caractérise l'interaction du monomère GdL3 avec le peptide étudié. Dans le cas du peptide A β ₁₋₄₀ (Annexe2, Figure III.7), on retrouve le même comportement, la dernière intersection se situant à 12.5nM.

Evidemment, chaque pente permettrait de calculer une valeur de K_D . Plus la pente est grande, moins le K_D est important et plus l'affinité est élevée ; les valeurs ainsi obtenues sont représentées sur les Figures III.7 et III.8. Or, à ce stade il nous semble difficile à interpréter

plus précisément ces différents K_D et les attribuer à une structure ou une forme d'agrégat, d'autant plus que leur variation n'est pas monotone avec la concentration. On doit également considérer que même dans une situation « simple » où il n'y aurait qu'un seul type de micelle (agrégat), cette micelle et la forme monomérique co-existent toujours au-dessus de la CMC, et donc le K_D mesuré peut être une valeur « effective » qui moyenne les affinités du monomère et de la forme micellaire. On pourrait spéculer aussi que c'est uniquement les monomères qui interagissent avec le peptide et ainsi les différentes affinités détectées (différents régimes) indiquent simplement que la concentration du monomère présent change en fonction de la concentration totale du complexe. La variation non-monotone des pentes semble à priori contredire cette hypothèse. Enfin, on note également que, de façon générale, les K_D déterminées par des représentations de Scatchard sont moins précis, car cette analyse met une pondération trop importante sur les points expérimentaux mesurés aux concentrations plus petites et qui sont donc moins précis.

Néanmoins, même sans interprétation plus poussée, il reste intéressant à constater que différents régimes d'affinité peuvent être démarqués en analysant les résultats SPR. Enfin, on note que c'est la première fois, à notre connaissance, que ce type d'analyse a été conduit pour les interactions entre complexes métalliques et peptides amyloïdes.

ii. Influence de la charge :

Toutes ces études ont été réalisées à $\text{pH} = 7.4$, où les trois complexes sont neutres. En ce qui concerne les peptides, à ce pH l'amyline possède une charge globale positive avec un $\text{pI} = 8.9^{10}$ alors que l' $\text{A}\beta_{1-40}$ est chargé négativement avec un $\text{pI} = 5.3$. Pour voir l'influence de la charge sur l'affinité, nous avons fait des expériences SPR avec le ligand L2 non-complexé et nous l'avons comparé aux résultats avec GdL2.

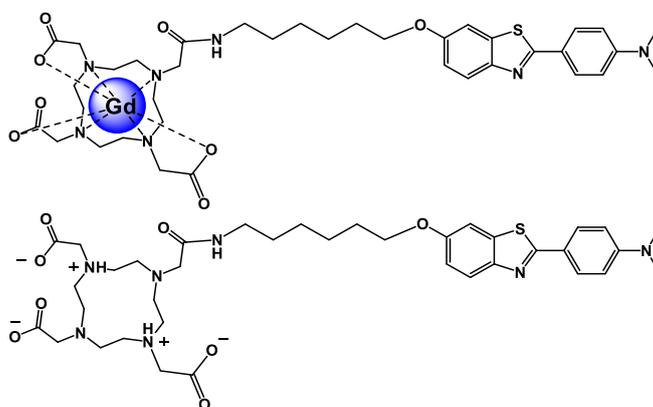


Figure III.9: Le complexe GdL2 et le ligand L2 à $\text{pH} 7.4$.

A pH 7.4, le ligand L2 (Figure III.9) comporte 3 fonctions carboxylates déprotonés et deux ammoniums au niveau du macrocycle qui sont protonées, ce qui donne une charge globale négative (-1). Les résultats obtenus avec amyline et A β ₁₋₄₀ montrent que les constantes de dissociation restent du même ordre de grandeur pour le ligand seul que pour le complexe.

Tableau III.4: Comparaison des constantes de dissociation de L2 et GdL2 avec l'amyline et l'A β ₁₋₄₀.

	L2	
Métal complexé	–	Gd ³⁺
Charge	-1	0
K_D Amyline (μM)	25	17
K_D Aβ₁₋₄₀(μM)	55	16

Néanmoins, on peut remarquer que, pour l'amyline qui est positivement chargé, il y a peu d'influence de la charge (Tableau III.4), alors que pour le peptide A β ₁₋₄₀ chargé négativement, la différence est plus marquée. En effet, la charge négative du ligand peut engendrer une répulsion électrostatique avec le peptide A β ₁₋₄₀. Cette dernière reste cependant faible car la charge du ligand se situe au niveau de la partie macrocyclique, qui reste éloignée du site d'interaction.

2.5 Bilan sur les résultats SPR

Premièrement, nous avons montré que, compte tenu de la différence de masse entre les analytes et les ligands, plus la quantité de peptide immobilisé sur les sensorchips est importante, plus nous pouvons accéder à des interactions à de plus faibles concentrations, chose impossible à un niveau d'immobilisation faible.

Pour la HSA, les trois complexes ne présentent pas des constantes de dissociation du même ordre de grandeur, l'affinité étant plus forte pour les composés lipophiles (36μM pour GdL3). En ce qui concerne les peptides, les constantes de dissociation « globaux » ont été d'abord obtenues par une analyse des données expérimentales selon le modèle simple 1 : 1 de Langmuir. A première vue, ces K_D sont du même ordre de grandeur (3-70μM) pour tous les trois complexes et tous les deux peptides. Néanmoins, une seconde étude réalisée avec un niveau d'immobilisation plus fort sur les sensorchips, a permis, dans le cas de GdL3, d'obtenir une affinité d'environ 4nM, dans le cas des deux peptides. Dans ce cas nous pouvons développer l'hypothèse suivante : à faible concentrations, le complexe est dans un

état monomérique où la partie ciblant PiB est parfaitement disponible pour interagir avec le peptide, ce qui conduit à une interaction forte, d'une affinité similaire à celle du PiB seul.

La présence de ces différents régimes selon la gamme de concentration étudiée a nécessité une analyse plus fine des résultats expérimentaux. Par conséquent, nous avons opté pour un modèle de linéarisation des résultats avec la représentation Scatchard. Avec cette méthode, nous avons pu clairement identifier que selon la gamme de concentration du complexe GdL1-3, les interactions sont différentes. En effet, des ruptures de pentes sont observées pour chacun des systèmes mettant en évidence plusieurs régimes d'interaction.

Ces ruptures de pentes sur les droites de Scatchard correspondent à des concentrations proches des valeurs que nous avons déterminées en CMC. Ceci suggère que le type d'interaction dépend de la forme des complexes dans la solution (monomère, micelles ou d'autres types d'agrégats).

3. Etude de l'agrégation des peptides en présence de GdL1-3 par dichroïsme circulaire

D'une façon générale, les molécules qui interagissent avec les peptides amyloïdes peuvent influencer la vitesse d'agrégation de ceux-ci comme c'était démontré dans le cas des peptides $A\beta_{1-40}$ ^{6,11} ou amyline¹².

Pour l' $A\beta_{1-40}$, la forme monomérique est généralement dominée par des structures en pelote ou aléatoire (random coil) à température ambiante et à pH physiologique¹³⁻¹⁶. Ensuite, des oligomères se forment pour finir avec des structures ordonnées de fibres¹⁷. L'influence de différentes molécules, comme le congo Red, le lacmoïd, des surfactants amphiphiles, ainsi que des complexes de gadolinium⁶ a été testée sur l'agrégation. La technique de choix était la spectroscopie de dichroïsme circulaire (DC), et les résultats indiquent que certains composés augmentent la vitesse d'agrégation alors que d'autres la diminuent.

Dans le cadre de ce projet, nous allons suivre, par la spectroscopie de dichroïsme circulaire, l'influence des complexes GdL1-3 sur la vitesse d'agrégation des peptides amyloïdes $A\beta_{1-40}$ et amyline. Il est à noter que l'effet de GdL1 sur l'agrégation de l' $A\beta_{1-40}$ a déjà été étudié auparavant.⁶ Cependant, nous allons refaire ces expériences également, car nos conditions opératoires sont différentes (concentrations en peptide plus faibles et nous travaillerons en absence de tampon, qui a une grande influence sur la structure des complexes en solution).

3.1 Principe de la technique

La spectroscopie de dichroïsme circulaire utilise une lumière polarisée qui est la réflexion de la lumière naturelle sur un miroir qui a fait perdre à la lumière sa symétrie de propagation (Figure III.10), et donc nous parlons de lumière polarisée circulairement vers la droite et de lumière polarisée circulairement vers la gauche.

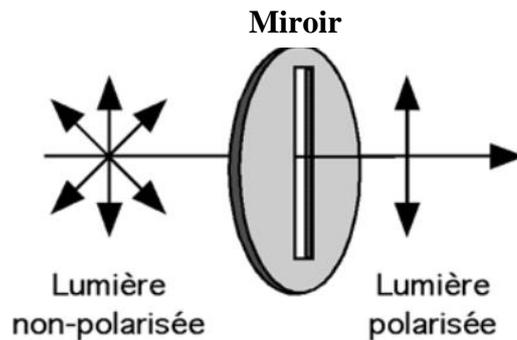


Figure III.10: Lumière polarisée

Une substance optiquement active possède un pouvoir rotatoire qui se traduit par la variation en fonction de la longueur d'onde λ de l'angle de rotation α . Cet angle dépend de la déformation de deux vibrations circulaires (Figure III.11); une vibration circulaire gauche et une vibration circulaire droite. Ces vibrations possèdent chacune une vitesse de propagation.

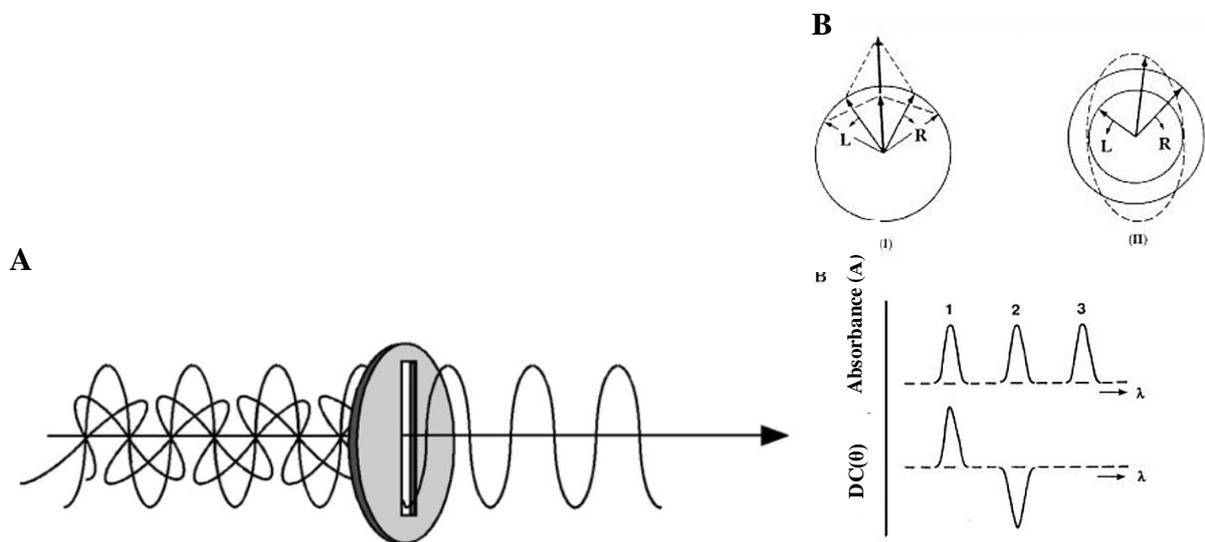


Figure III.11: Superposition des deux lumières polarisées circulairement gauche et droite (A), 1 : bande positive (L absorbe plus que R), 2 : bande négative (R absorbe plus que L), 3 : chromophore achirale (pas d'absorption) (B).

Chapitre III : Complexes avec un bras de ciblage

Dans le cas d'une dispersion anormale, c'est-à-dire dans le cas où le milieu est absorbant, la vibration rectiligne incidente est composée des deux vibrations circulaires (Figure III.11) qui peuvent être inégalement absorbées donnant comme résultante une vibration elliptique caractérisée par l'angle θ .

θ est également l'unité utilisée en DC et est calculée comme suit :

$$[\theta] = \frac{(2.303 * \Delta A * 180)}{4\pi} * \frac{1400}{C * l} = 3298 * \Delta \epsilon \quad \text{III.2}$$

$$\Delta \epsilon = (\epsilon_L - \epsilon_R) = \frac{\Delta A}{C * l} \quad \text{III.3}$$

$$\Delta A = A_L - A_R \quad \text{III.4}$$

Avec :

C : la concentration de la protéine en mol/L

l: Trajet optique dans la cuve en cm

θ : Ellipticité molaire en deg.cm²/dmol

$\Delta \epsilon$: Variation de coefficient d'extinction molaire L.mol⁻¹.cm⁻¹

ΔA : Variation de l'absorbance

L : gauche

R : droite

Or, dans le cas des peptides, il faut tenir compte de la concentration du peptide ainsi que du nombre d'acides aminés d'où l'expression de l'ellipticité molaire par résidu :

$$[\theta] = \frac{(2.303 * \Delta A * 180)}{4\pi} * MRW * \frac{1400}{10 * C * L} = 3298 * \Delta \epsilon \quad \text{III.5}$$

$$MRW = \frac{M}{N-1}$$

Avec :

M= masse de la protéine en Da

N= nombre d'acide aminés

Toute molécule optiquement active présente normalement le dichroïsme circulaire. Grâce à leur chiralité, les molécules biologiques, comme les acides aminés et certains sucres possèdent donc cette propriété. Pour les peptides, la structure secondaire joue également un

rôle sur leur dichroïsme. En effet, les structures en hélice alpha et feuillet bêta des protéines présentent des dichroïsmes circulaires caractéristiques.

Ainsi, le dichroïsme circulaire va permettre de déterminer l'effet des complexes GdL1-3 sur la structure secondaire du peptide. De façon générale, avant d'arriver à un état insoluble, les peptides amyloïdes passent par différentes conformations. Le point de départ est représenté par les structures secondaires non définies (random coil). Sur les spectres DC (Figure III.12), elles sont caractérisées par un minimum négatif à ~ 190 nm. Une structure secondaire en hélice α est caractérisée par un pic positif vers 185 nm et deux pics négatifs vers 205 et 222 nm respectivement. Enfin, la structure en feuillet β est représentée par une courbe DC avec un maximum à 190 nm et un minimum négatif à 215 nm, comme illustre la figure III.12. Après cet état, le peptide amyloïde finit par précipiter et plus aucun spectre DC n'est détectable dans la solution.

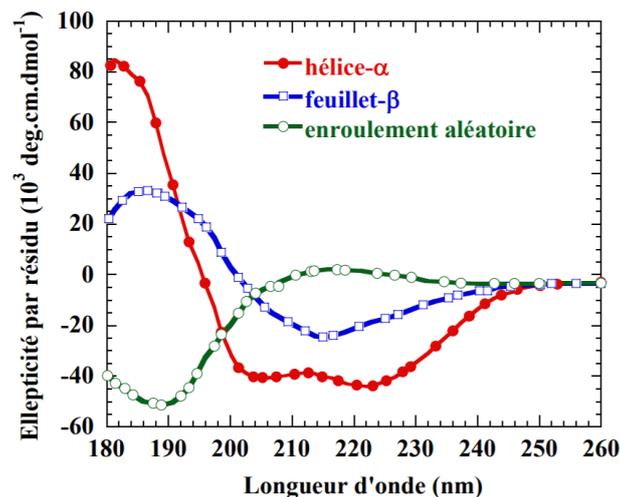


Figure III.12: Spectres typiques de différentes structures secondaires; en hélices- α , feuillets- β et en pelote (structure aléatoire).

3.2 Peptides amyloïdes Amyline et A β_{1-40}

Dans l'équipe, l'effet de deux complexes, Gd(DO3A)PiB et GdL1, a déjà été testé à différentes concentrations (0, 40, 80, 160 et 400 μM ; à pH 7.3) sur l'agrégation de l'A β_{1-40} (40 μM). Cette étude a été réalisée en suivant les spectres DC des échantillons dans le temps⁶.

Il a été conclu que le Gd(DO3A)PiB, à faible ratio, favorise la formation des feuillets β de A β_{1-40} et cette conformation semble dominer. Au contraire, GdL1 stabilise la conformation en hélice α du peptide pour tous les ratios étudiés et même après 20 jours, la conformation en hélice α était la forme dominante. Donc ces expériences ont montré que GdL1 avait tendance à ralentir le processus d'agrégation de l'A β_{1-40} .

Chapitre III : Complexes avec un bras de ciblage

Afin de pouvoir étudier l'effet de la structure des complexes, nous allons suivre l'influence des trois complexes GdL1, GdL2 et GdL3 sur l'agrégation de chacun des deux peptides $A\beta_{1-40}$ et amyline.

L' $A\beta_{1-40}$ est bien plus facile à étudier par rapport à l'amyline. Ce dernier est tellement amyloïdogénique qu'il est difficile, voire impossible de définir l'état natif soluble du peptide. Ceci peut s'expliquer par la présence d'un pont disulfure dans la structure de l'amyline et pas dans celle de l' $A\beta_{1-40}$ (Figure III.13). Les observations varient selon les méthodes de préparation (lot, préparation et désagrégation), le pH, et le solvant utilisé pour solubiliser le peptide (HFIP, DMSO...). De plus, l'utilisation d'une solution mère concentrée complique encore la situation car elle peut déjà contenir des agrégats (les concentrations élevées accélèrent l'agrégation). La conformation *in vivo* de l'amyline reste également inconnue, aussi bien dans la cellule pancréatique dans les îlots de Langerhans que dans la circulation sanguine.

La figure III.13 compare la structure primaire de l' $A\beta_{1-40}$ et de l'amyline.

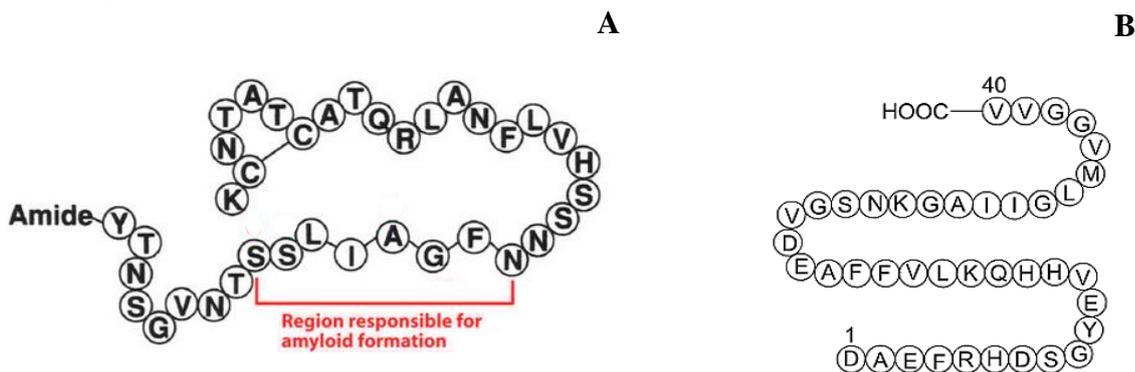


Figure III.13: Présentation schématique de la structure primaire de l'amyline (A)¹⁸ présentant un pont disulfure entre les deux cystéines et une fonction amide en terminaison, et du peptide $A\beta_{1-40}$ (B) avec un acide en terminaison.

Dans un premier temps, nous avons étudié le comportement de chaque peptide seul pendant 6 jours. Nous avons choisi de travailler sur une concentration de $25\mu\text{M}$ de l' $A\beta_{1-40}$, alors que la concentration de l'amyline était de $15\mu\text{M}$ pour des raisons de sa plus faible solubilité.

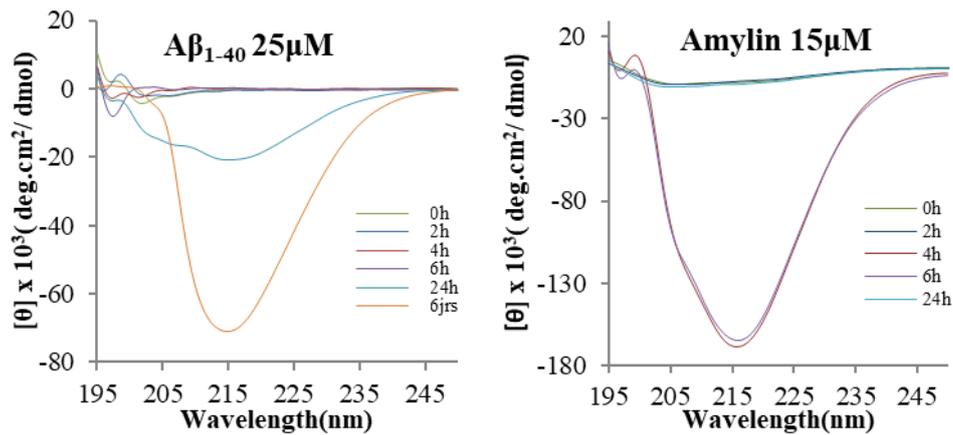


Figure III.14: Evolution des spectres de DC en fonction du temps pour l'Aβ₁₋₄₀ (à gauche) à 25μM et l'amyline à 15μM (à droite) à pH 7.4 et 37°C.

Selon ces spectres DC, le peptide Aβ₁₋₄₀ présente au début des hélices α (minimum à ~209 nm) et par la suite des feuillets β (minimum ~215 nm) à partir de 24 h. Six jours après, le peptide est toujours en solution et la conformation majoritaire est celle de feuillet β, caractérisée par un pic à 215 nm.

Pour l'amyline, nous observons une agrégation beaucoup plus rapide que pour l'Aβ₁₋₄₀, comme déjà décrit dans la littérature¹⁹⁻²¹. Au bout de 4h, un mélange de structures est observé. Ce mélange d'hélices α et feuillets β persiste jusqu'à 6 h avec un pic très intense. Au bout de 24h, le signal est presque inexistant car le peptide est précipité; en effet, nous remarquons des dépôts à l'intérieur des cuves de mesure.

Il est décrit que l'amyline s'agrège plus vite que l'Aβ₁₋₄₀ mais il est à noter que les peptides amyloïdes et l'amyline en générale non pas un modèle de repliement standard ce qui pourra éventuellement influencer l'interaction avec les complexes étudiés²¹. De plus, pour l'amyline la préparation des solutions a également un effet très important. Par exemple, la dilution à partir d'une solution de 40μM pour obtenir une solution à 15μM conduit à une agrégation plus rapide que celle observée dans une solution directement préparée à 15μM, comme montre la Figure III.15.

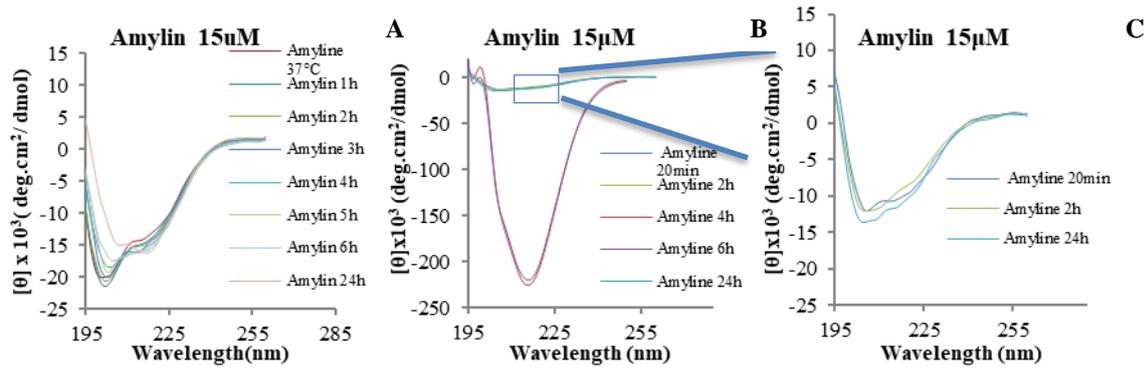


Figure III.15: Spectre DC d'une solution d'amyline directement préparée à 15µM (A) ; diluée à 15 µM à partir d'une solution mère de 40µM (B) et l'agrandissement de l'échelle (C), dans l'eau à pH7.4, à 37°C.

Entre les graphes 15A et 15B et C à 2h, nous avons les mêmes conformations, un mélange de structures aléatoires (random coil) et des hélices α . Ensuite, dans l'échantillon dilué à partir d'une solution concentrée (Figure III.15B), à partir de 4h les intensités présentant des conformations α et surtout β deviennent 10 fois plus grandes, et par la suite la précipitation d'une partie du peptide survient rapidement, détectée par la chute des intensités des spectres DC, mais également visuellement dans la cuve. On remarque que le spectre du peptide qui reste toujours en solution a une forme similaire à celle du début, juste après la préparation de l'échantillon (spectres à 20 min et 24h, Figure III.15C).

Nous pouvons conclure sur cette partie, que la concentration de la solution mère du peptide peut agir sur la vitesse d'agrégation et pour des solutions plus concentrées, l'état d'agrégation au départ peut être déjà plus avancé.

3.3 Etude de l'agrégation d'A β ₁₋₄₀ en présence de GdL1-3

Nous avons préparé des mélanges peptide:complexe en gardant la concentration A β ₁₋₄₀ constante à 25µM et en variant la concentration du complexe (2.5 µM ; 25 µM, 50 µM et 250 µM) correspondants à des ratios peptide:complexe de 1 : 01 ; 1 : 1 ; 1 : 2 et 1 : 10. Les mesures DC ont été faites dans l'eau à pH 7.4 et à 37 °C.

Selon la figure III.12, les courbes du DC correspondantes à des valeurs de λ inférieurs à 205nm atteignent des valeurs positives, or dans ce que nous allons présenter le signal est pratiquement inexistant à ces valeurs de λ . De ce fait, le détecteur est considéré comme saturé. C'est pourquoi, cette partie des courbes ne sera pas interprétée.

i. GdL1

Nous avons étudié l'effet du GdL1 sur la vitesse d'agrégation du peptide $A\beta_{1-40}$ en enregistrant les spectres DC pendant 24 h pour les différents ratios (Figure III.16)

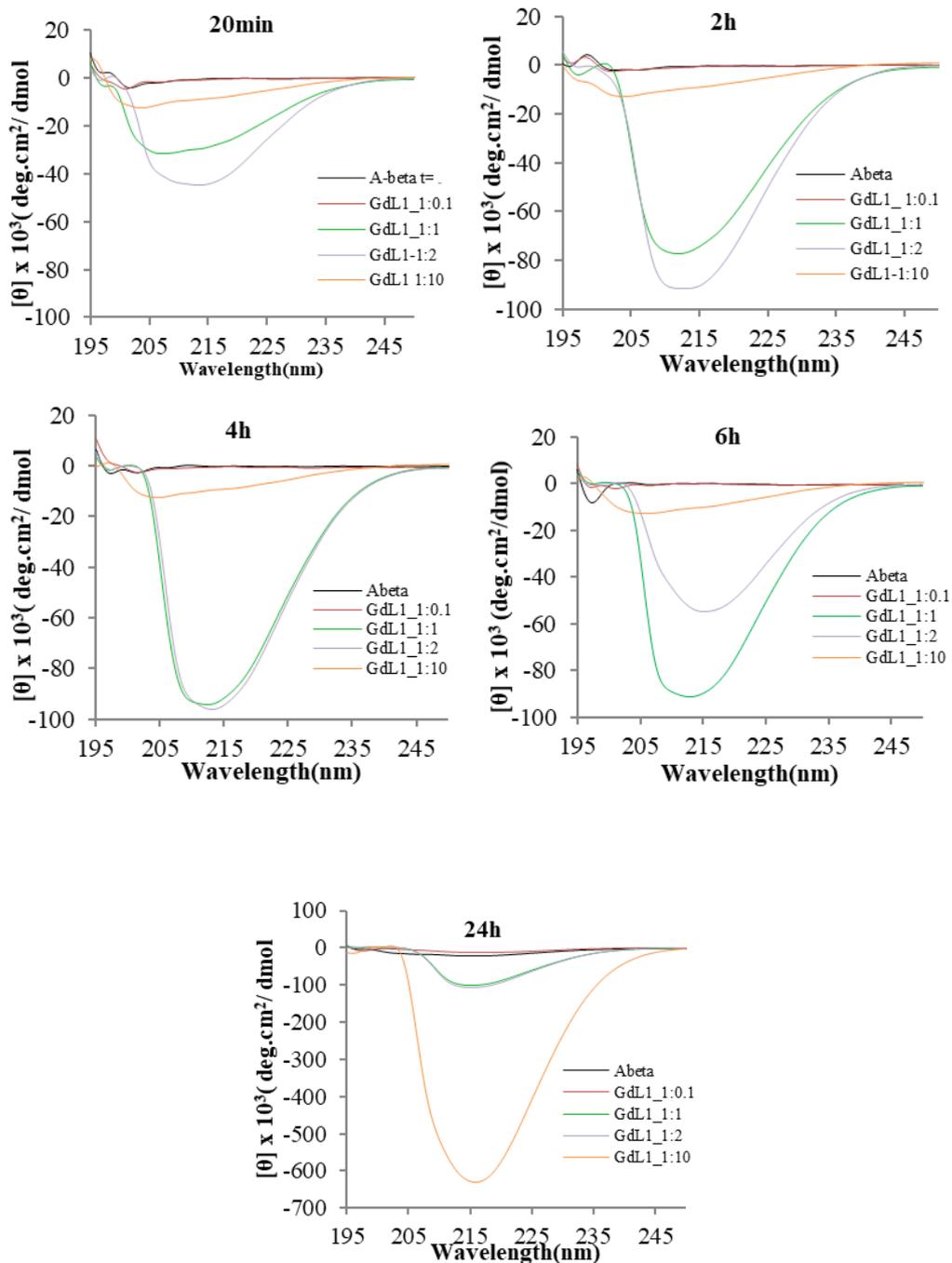


Figure III.16: Spectres DC de $25\mu\text{M}$ $A\beta_{1-40}$ dans l'eau à pH7.4, à 37°C en présence de différentes concentrations de GdL1 ($2.5\mu\text{M}$, $25\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$, $250\mu\text{M}$) à différents temps (0h, 2h, 4h, 6h, 24h).

Premièrement, en présence de 0.1 équivalent de complexe, le processus d'agrégation n'est pas ou peu influencé. Au bout de 24h, le peptide adopte une structure similaire que sans GdL1.

En revanche, lorsque la concentration du complexe augmente (ratios 1 :1 et 1 :2), le processus d'agrégation du peptide devient plus rapide ; les résultats pour les deux ratios étant très proches. En ce qui concerne le ratio 1:10, on observe une vitesse d'agrégation moins rapide que les ratios plus faibles, mais plus rapide que pour le peptide seul. La structure majoritairement en feuillet β n'apparaît qu'à 24h, contre le temps 2h pour les ratios 1:1 et 1:2.

Globalement, dans ces expériences, GdL1 a plutôt accéléré la vitesse d'agrégation de l'A β ₁₋₄₀. Par contre, cette tendance n'est pas monotone en fonction de la concentration de GdL1. Toutes ces concentrations sont au-dessous de la CMC du GdL1 (~1 mM) mesurée dans l'eau, mais il est assez probable qu'en présence du peptide, la valeur de la CMC va diminuer. Néanmoins, la seule chose qu'on puisse dire est que le système est très complexe et la rationalisation de l'effet de la concentration du GdL1-3 sur l'agrégation semble difficile.

Par ailleurs, on note également que nos résultats sont différents de ceux reportés précédemment pour GdL1⁶, où ce complexe semblait plutôt ralentir l'agrégation du peptide. Il y a deux différences notables entre les deux séries d'expériences. Dans notre cas, la concentration du peptide est moins élevée (25 μ M au lieu de 40 μ M), et par conséquent, les concentrations du GdL1 sont également moins importantes car les mêmes peptide/GdL1 ratios ont été respectés. D'autre part, la préparation de la solution du peptide est aussi différente (voir Partie expérimentale).

En effet, nous avons testé l'effet d'une concentration élevée de complexe présenté par un ratio peptide:complexe de 1:10. Nous constatons que l'agrégation moins rapide pourrait s'expliquer par l'apparition de particules complexes (taille de 625nm) marquées par des intensités particulièrement élevées (Figure III.16 (24h)). Ce qui affirme l'hypothèse qui justifie la différence entre les anciens et les nouveaux résultats.

ii. GdL2

Nous avons étudié l'effet de GdL2 dans les mêmes conditions (Figure III.17).

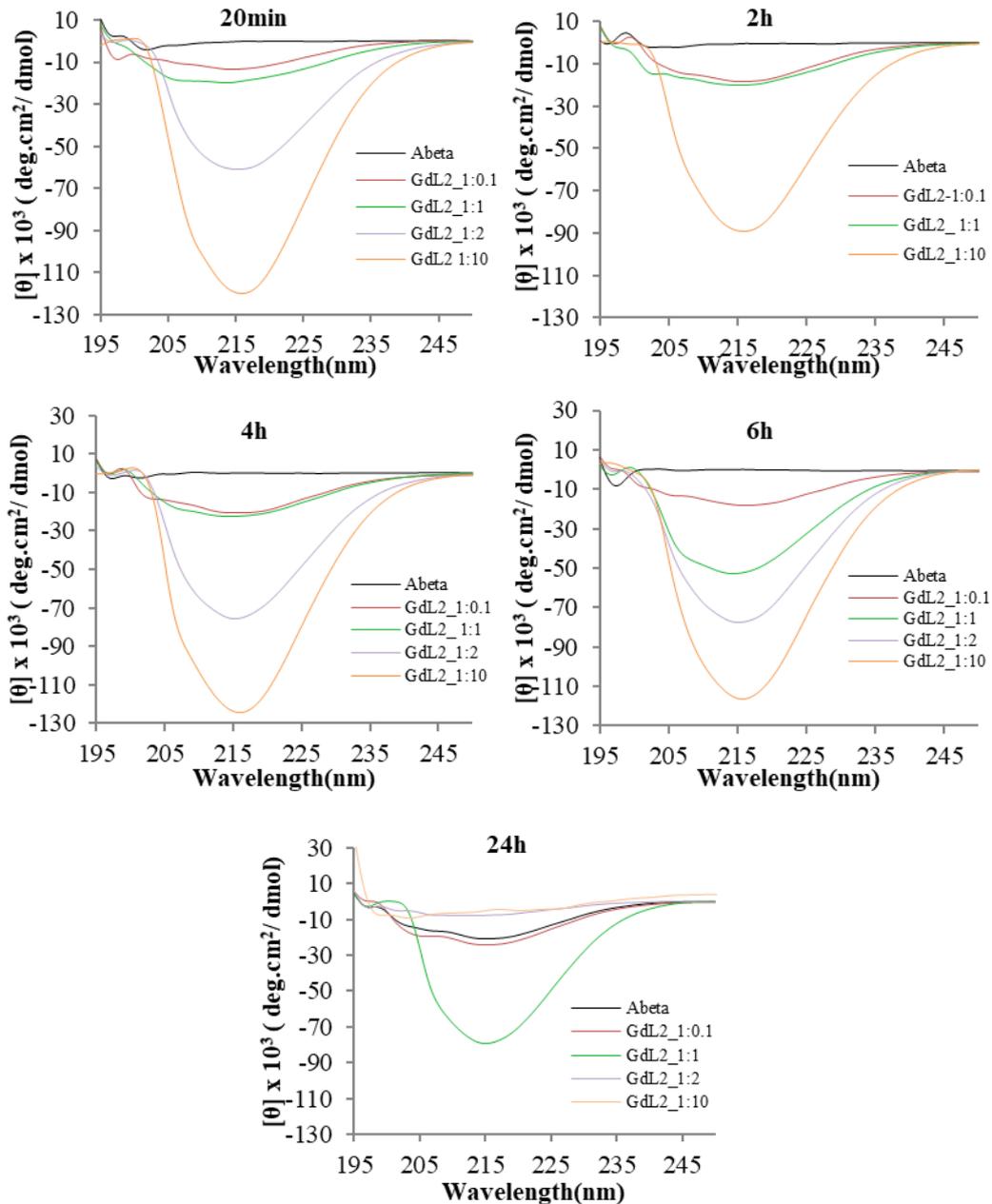


Figure III.17: Spectre DC de 25 μ M d'A β 1-40 dans l'eau à pH7.4, à 37°C en présence de différentes concentrations de GdL2 (2.5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 250 μ M) à différents temps (0h, 2h, 4h, 6h, 24h).

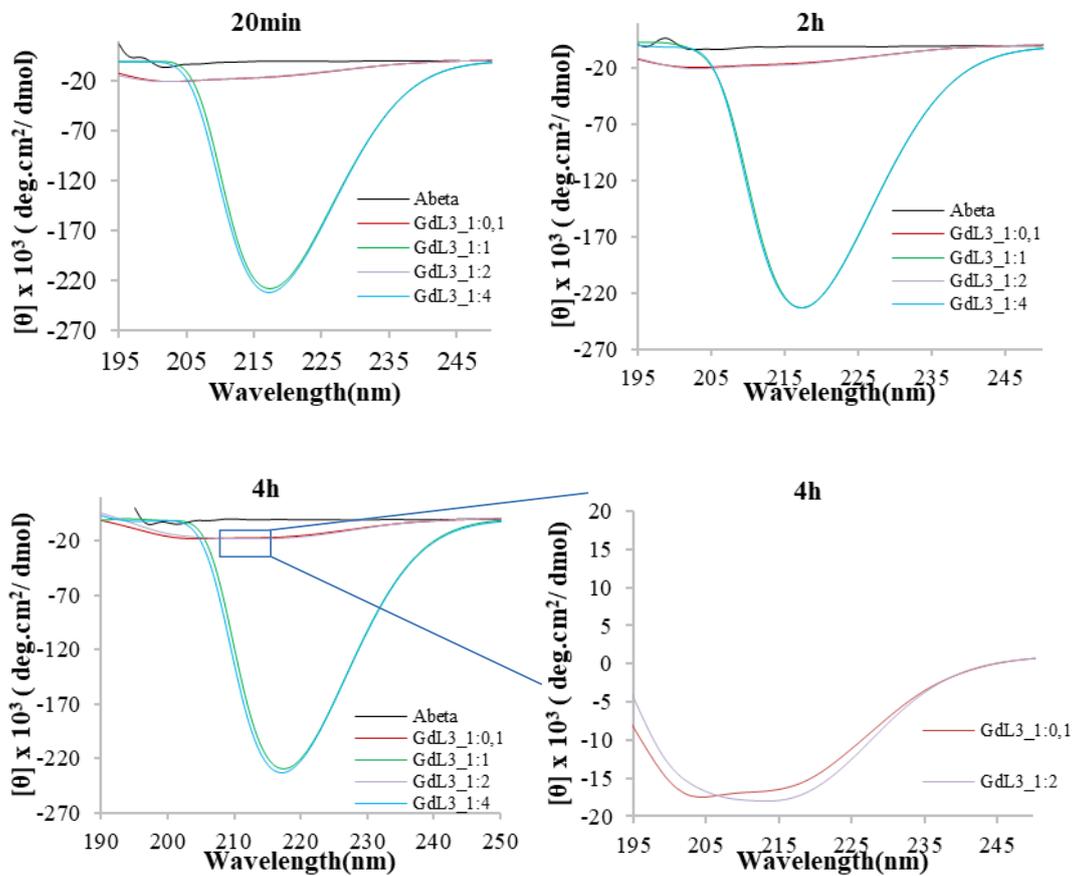
Pour le ratio peptide:complexe 1:0.1, le peptide semble adopter immédiatement une conformation (α , β ou leur mélange) et la garder pendant 24h. En effet, on ne constate aucun changement du spectre DC entre 20 min et 24h.

Pour les autres ratios, le processus d'agrégation du peptide A β 1-40 semble s'accélérer lorsqu'on augmente la concentration du complexe. A $t = 20$ min, le peptide en présence de 2 et 10 équivalents de complexe présente déjà une structure de mélange d'hélice α et de feuilletts

β . Par contre pour le ratio 1:1, on ne retrouve ces conformations secondaires en α et β qu'après 4h (bien avant que le peptide seul). De plus à 24h, pour les mélanges 1:2 et 1:10 le peptide a précipité ce qui explique l'absence de signal, alors que dans le mélange 1:1, il est encore en solution sous la forme majoritaire de feuillets β . Ceci confirme que ce complexe GdL2 accélère la vitesse d'agrégation et que plus la concentration du complexe augmente, plus la vitesse de l'agrégation s'amplifie.

iii. GdL3

Dans le cas de GdL3, l'étude du ratio 1:10 (concentration du complexe 250 μ M) n'était pas possible à cause de la faible solubilité de GdL3.



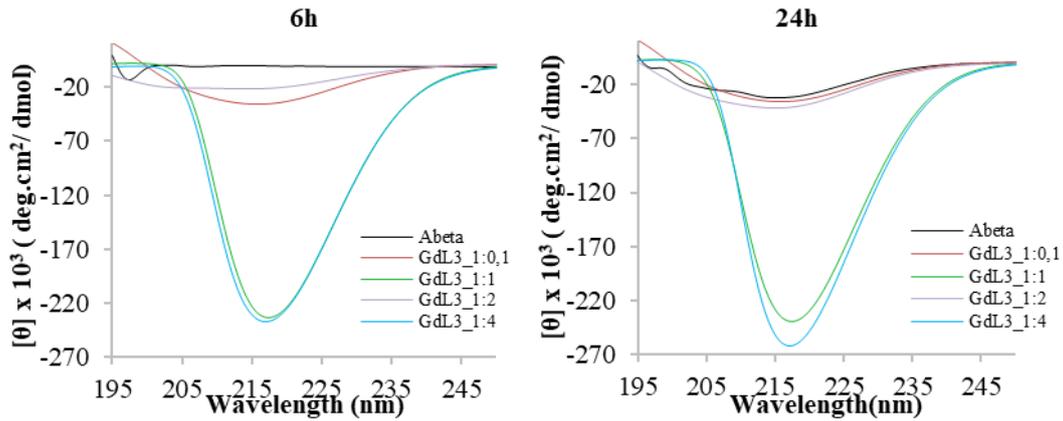


Figure III.18: Spectre DC de 25µM de Aβ₁₋₄₀ dans l'eau à pH7.4, à 37°C en présence de différentes concentrations de GdL3 (2.5µM, 25 µM, 50 µM, 100µM) à différents temps (0h, 2h, 4h, 6h, 24h).

Sur les spectres de la Figure III.18, on remarque deux comportements distincts suivant les ratios étudiés. Premièrement, nous pouvons regrouper les ratios 1:1 et 1:4 (concentrations respectives de GdL3 de 25 et 100 µM). En effet, dans ces deux cas, les spectres DC montrent que dès la première mesure, la conformation du peptide semble correspondre à une structure en feuillet β, et ne varie que très peu (l'intensité du signal augmente légèrement) au cours du temps. Pour les deux autres ratios (1:0.1 et 1:2 ; concentrations respectives de GdL3 de 2.5 et 50 µM), on note une évolution classique au cours du temps, où le peptide se situe en random coil pour la première mesure. Ensuite, on observe l'apparition d'une structure en hélice α à 2h qui devient majoritaire entre 4h et 6h, et d'une conformation majoritairement en feuillet β au bout de 24h. Le processus d'agrégation est tout de même plus rapide que pour le peptide seul.

Ce comportement non-monotone en fonction de la concentration du GdL3 pourrait correspondre aux différents régimes que l'on a pu identifier par SPR pour les interactions entre le peptide et les complexes (2 ruptures de pente sur les graphes Scatchard à 2.3µM et à 193µM). Les faibles pentes où l'interaction semble être moindre, pourraient correspondre aux cas où l'influence du complexe GdL3 est la plus petite. A contrario, les fortes pentes marquent des interactions plus fortes et l'effet du complexe serait donc plus remarquable sur les spectres DC des ratios 1:0.1 et 1:2 où on constate une structure stable du peptide au cours du temps.

3.4 Bilan : Agrégation de l'Aβ₁₋₄₀

D'une façon générale, les complexes ont tendance à amplifier la vitesse d'agrégation du peptide Aβ₁₋₄₀. Il apparaît également qu'à certaines concentrations, les complexes ont des interactions particulières avec le peptide, notamment dans le cas du GdL3 puisque dans certaines conditions, le peptide adopte une conformation tout de suite après la préparation de l'échantillon qui n'évolue quasiment plus au cours du temps. Ceci pourrait être lié à l'état d'agrégation (micellisation) des complexes en solution qui, comme nous avons pu le montrer dans le chapitre précédent, varie fortement avec la concentration.

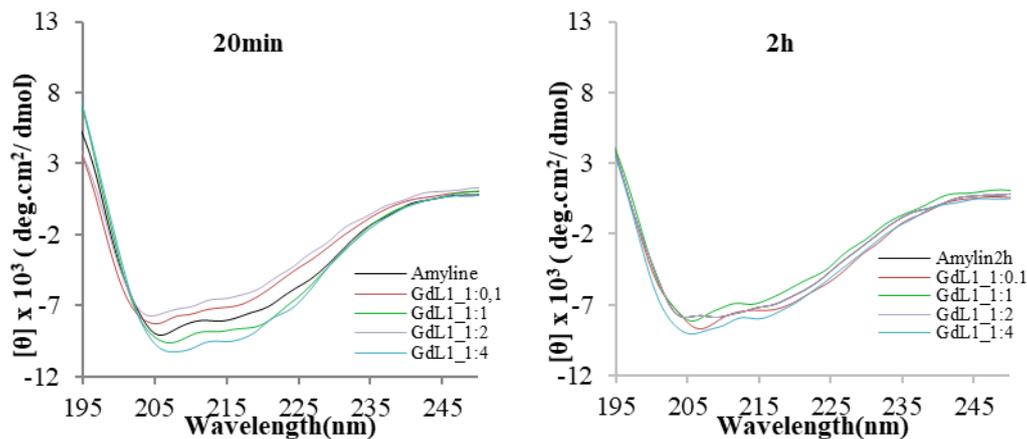
Il reste à savoir si cette tendance est spécifique au peptide Aβ₁₋₄₀.

3.5 Etude de l'agrégation de l'amyline en présence de GdL1-3

Nous avons procédé avec le même protocole pour étudier l'agrégation de l'amyline en présence de nos complexes, mais les ratios des complexes variaient entre 0.1, 1, 2 et 4 et la concentration du peptide était de 15 μM.

i. GdL1

Les spectres DC obtenus en fonction du temps sont représentés sur la Figure III.19.



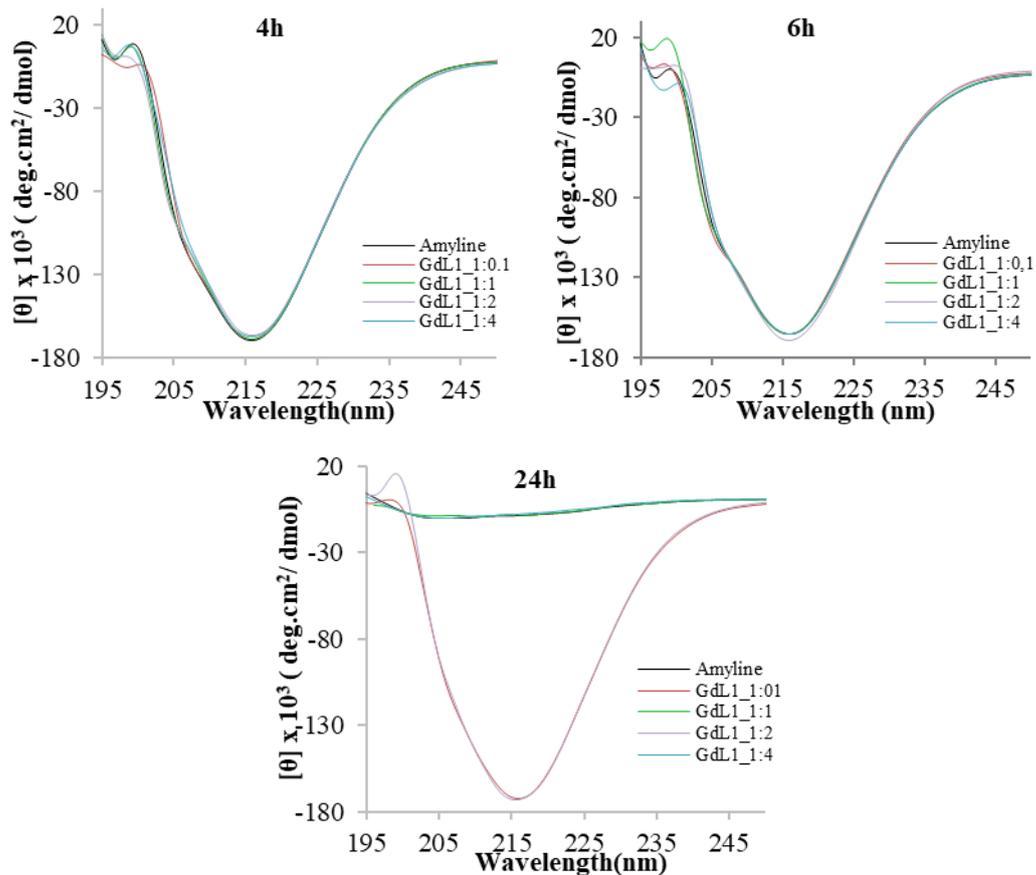


Figure III.19: Spectre DC de 15 μ M d'amyline dans l'eau à pH7.4, à 37°C en présence de différentes concentrations de GdL1 (1.5 μ M, 15 μ M, 30 μ M, 60 μ M) à différents temps (0h, 2h, 4h, 6h, 24h).

Nous constatons que l'agrégation de l'amyline en présence du complexe, quel que soit la concentration de ce dernier, suit l'agrégation de l'amyline seul entre 20 min et 6h. En effet, les spectres DC obtenus sont similaires. Néanmoins, à 24 h, quand le peptide seul a déjà précipité, les solutions aux ratios 1:0,1 et 1:2 présentent encore des spectres donc le peptide est maintenu en solution sous une structure qui semble être majoritairement des feuillettes β . Ainsi seuls ces deux échantillons semblent montrer une influence du complexe sur le processus d'agrégation de l'amyline.

ii. GdL2

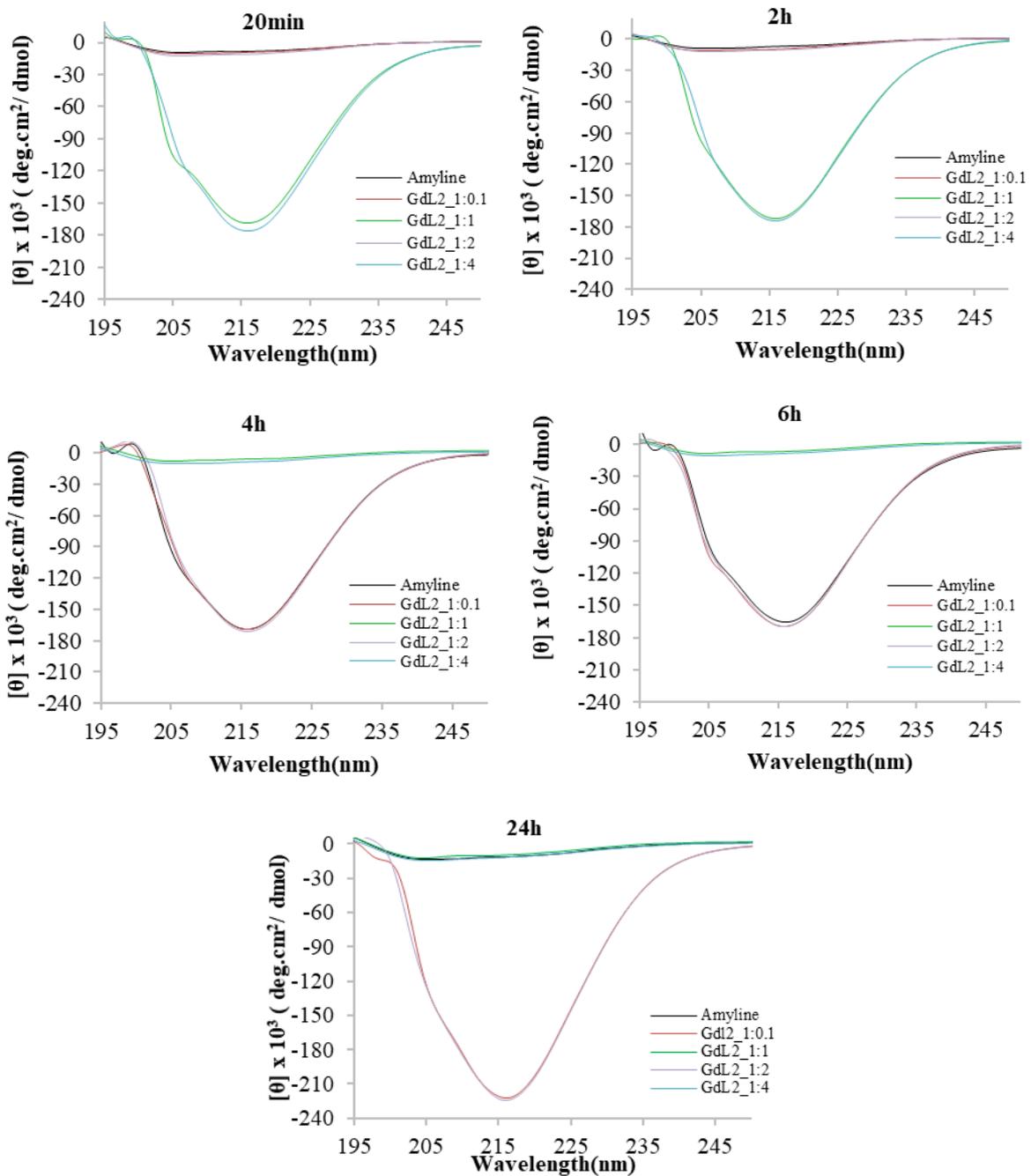


Figure III.20: Spectre DC de 15 μ M d'amyline dans l'eau à pH7.4, à 37°C en présence de différentes concentrations de GdL2 (1.5 μ M, 15 μ M, 30 μ M, 60 μ M) à différents temps (0h, 2h, 4h, 6h, 24h).

Comme montrent les spectres DC, les échantillons avec les ratios peptide:complexe 1:1 et 1:4 ont les mêmes allures. Ils présentent l'amyline majoritairement sous forme de feuillets β dès le début de l'expérience. Toutefois, le peptide précipite au bout de 4h. Ceci indique que ces concentrations de complexes accélèrent fortement l'agrégation du peptide.

Pour les ratios 1:0.1 et 1:2, nous n'observons, comme pour le peptide seul, des conformations secondaires qu'au bout de 4h. Cependant, à 24h, nous ne constatons pas de précipité dans les solutions, impliquant le maintien du peptide sous une conformation stable qui apparait sur le spectre DC comme un mélange d'hélice α et de feuillet β . L'influence sur l'agrégation de l'amyline semble être similaire, pour ces concentrations de complexe, entre GdL1 et GdL2.

iii. Cas de GdL3

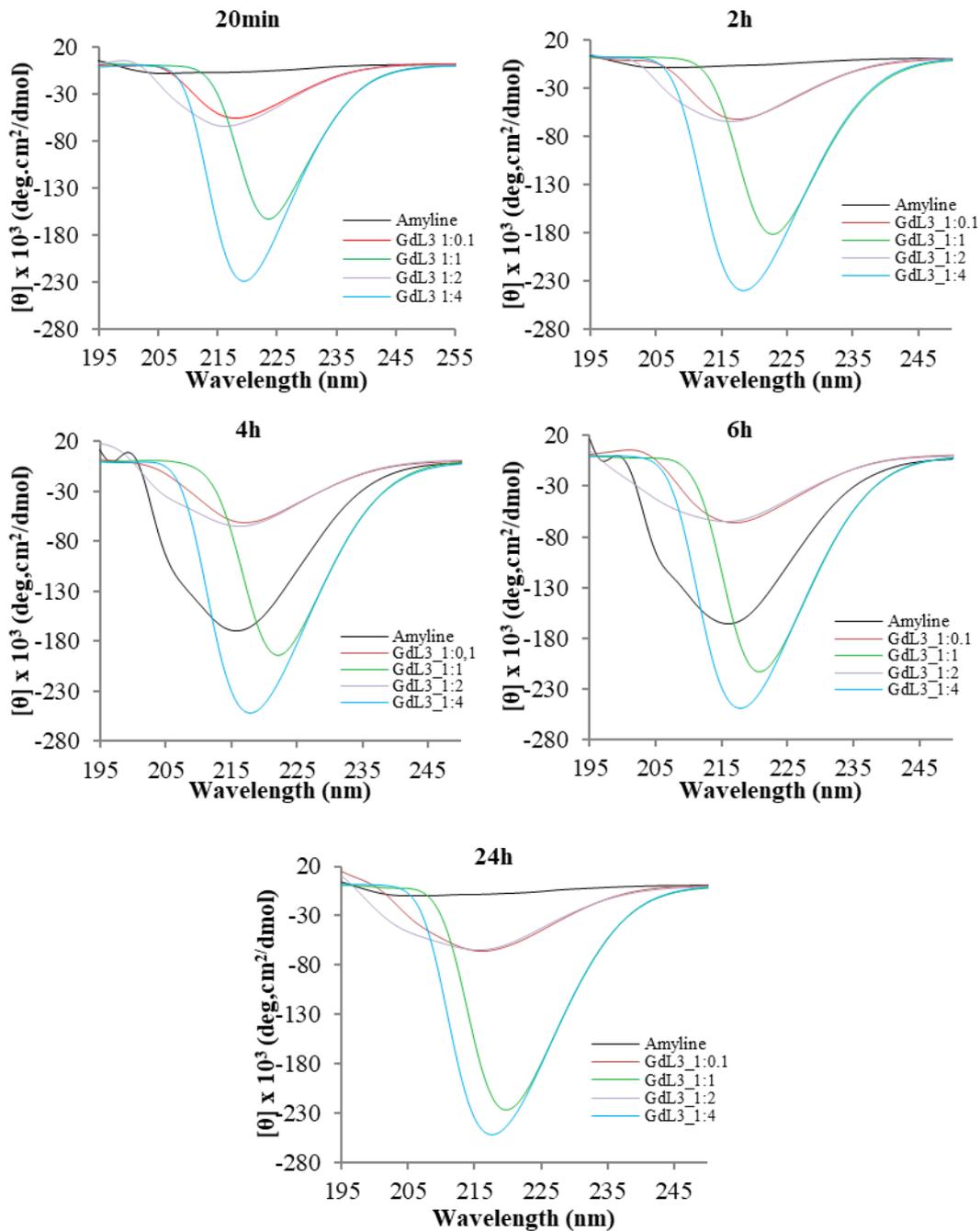


Figure III.21: Spectre DC de 15 μ M d'amyline dans l'eau à pH7.4, à 37°C en présence de différentes concentrations de GdL3 (1.5 μ M, 15 μ M, 30 μ M, 60 μ M) à différents temps (0h, 2h, 4h, 6h, 24h).

Comme nous pouvons constater sur la figure III.21, le GdL3 provoque la même tendance pendant les 24h, indépendamment des ratios. Les ratios peptide:complexes 1:0.1 et 1:2 présentent des courbes peu intenses et des mélanges de structures en feuillets α et β . Les ratios 1:1 et 1:4 présentent des courbes plus intenses et la conformation β semble être la plus présente. Ces conformations restent stables pendant 24h en gardant le peptide soluble. De nouveau, la variation n'est pas monotone avec la concentration du complexe.

3.6 Bilan : L'agrégation de l'amyline

Cette étude montre que, contrairement aux résultats obtenus avec le peptide $A\beta_{1-40}$, il n'y a pas de tendance marquée où l'agrégation est plus rapide en présence des complexes. L'influence des complexes sur l'amyline est surtout liée à leur concentration et, de ce fait, probablement à leur structure en solution.

Ainsi, pour les trois complexes, les concentrations 1.5 et 30 μM entraînent une stabilisation du peptide sous une structure qui semble être majoritairement des feuillets β et empêchent sa précipitation.

Dans le cas des concentrations 15 et 60 μM , les résultats sont variables suivant les complexes :

- GdL1 influence peu l'agrégation
- GdL2 accélère fortement l'agrégation de l'amyline. On peut noter que ce sont les deux seuls exemples où l'agrégation est plus rapide que celle du peptide seul.
- GdL3 stabilise immédiatement une structure du peptide qui semble bloquer le processus d'agrégation. Il semble que le peptide adopte une structure différente où les caractéristiques des hélices α sont plus présentes.

Pour conclure, le complexe GdL3 montre des propriétés intéressantes car il bloque l'agrégation de l'amyline.

Ces études, une nouvelle fois, indiquent un comportement variable et des changements non-monotones en fonction de la concentration des complexes. Ce phénomène est vraisemblablement lié aux différentes structures d'agrégat que les complexes adoptent en solution et qui vont également influencer leurs interactions avec les peptides amyloïdes. En effet, si on se réfère aux différentes valeurs de CMC obtenus, même si les conditions expérimentales ne sont pas parfaitement identiques, on peut plus au moins relier les changements de comportement des complexes entre les différents ratios étudiés aux différents régimes structuraux identifiés.

4. Etude de relaxométrie :

L'interaction entre un complexe paramagnétique et une autre molécule, surtout quand sa taille est importante comme celle des peptides, peut être étudiée par relaxométrie. Quand le complexe GdL1-3 se lie au peptide, sa relaxivité augmente puisque le complexe est immobilisé. Cette augmentation sera surtout observable à des fréquences dites intermédiaires (20-60 MHz) où l'effet de la rotation sur la relaxivité est le plus prononcé. Nous avons étudié l'interaction de nos complexes avec le peptide A β ₁₋₄₀ et la HSA en mesurant les relaxivités en fonction de la fréquence de Larmor de proton. Nous n'avons pas pu réaliser les mêmes expériences avec l'amyline puisqu'il s'agrège plus vite que le temps de l'expérience, à des concentrations typiquement exigées pour les études de relaxivité (au moins 0.25 mM).

Ici, nous avons étudié les interactions entre les complexes GdL2 et GdL3 et l'A β ₁₋₄₀ et la HSA, celles de GdL1 étant précédemment décrites²².

Les mesures de relaxivités demandent une concentration de Gd(III) relativement élevée (au moins une centaine de micromolaires), donc il n'est pas possible de mesurer les profils NMRD des complexes GdL2 et GdL3 sous forme monomérique. En effet, les valeurs de CMC sont autour de 0.06-0.08 mM et 0.01-0.03 mM respectivement pour GdL2 et GdL3 dans l'eau. Les courbes NMRD ont été donc obtenues à 0.20 mM (GdL2) et 0.225 mM (GdL3), à pH 7.4 et 25°C et 37°C (Figure III.22 & Figure III.23). Ces courbes montrent clairement la présence d'agrégats en solution, car on observe une bosse avec un maximum vers 60 MHz, signe d'une rotation lente. Les relaxivités sont légèrement plus élevées pour GdL3 que pour GdL2, ce qui peut être la conséquence d'une plus grande taille des particules formées, ou de leur plus grande rigidité. Il est intéressant à noter que les relaxivités ne varient pratiquement pas avec la température, au moins entre 25°C et 37°C, ce qui implique que l'effet de la rotation est compensé par l'effet de la vitesse d'échange d'eau en fonction de la température. En effet, la température a un effet inverse sur ces deux paramètres, tous les deux influençant la relaxivité.

En présence d'un équivalent du peptide A β ₁₋₄₀, le profil NMRD du GdL2 change légèrement. Si on examine les courbes à 37°C (Figure III.22 B), les relaxivités à hauts champs montrent une faible augmentation, indiquant un petit ralentissement dans la dynamique de rotation du complexe. En tenant compte du K_D déterminé (20 μ M), dans ces conditions on peut estimer que ~75% du complexe est lié au peptide. Par conséquent, la

petite différence dans les relaxivités détectées pour le complexe seul et en présence de l'Aβ₁₋₄₀.
40 semble indiquer que la dynamique de rotation est assez similaire à l'état micellaire du complexe et à l'état lié au peptide.

L'augmentation de la relaxivité en présence du peptide est bien plus importante pour GdL3 (Figure III.23). Sur la base du K_D déterminé précédemment (5 μM), on peut estimer que ~86 % du complexe est lié à l'Aβ₁₋₄₀. Même si une analyse complète de la courbe NMRD semble difficile, on peut conclure que la forte augmentation de relaxivité indique que la rotation du complexe est beaucoup plus lente dans l'état lié au peptide que dans l'état micellaire.

En présence du sérum albumine, la relaxivité augmente pour les deux complexes, car ils se lient à la protéine. Leur affinité est relativement faible à la HSA, mais la forme liée doit avoir une relaxivité très élevée étant donnée la taille de la HSA, qui conduit à une forte augmentation de la relaxivité observée.

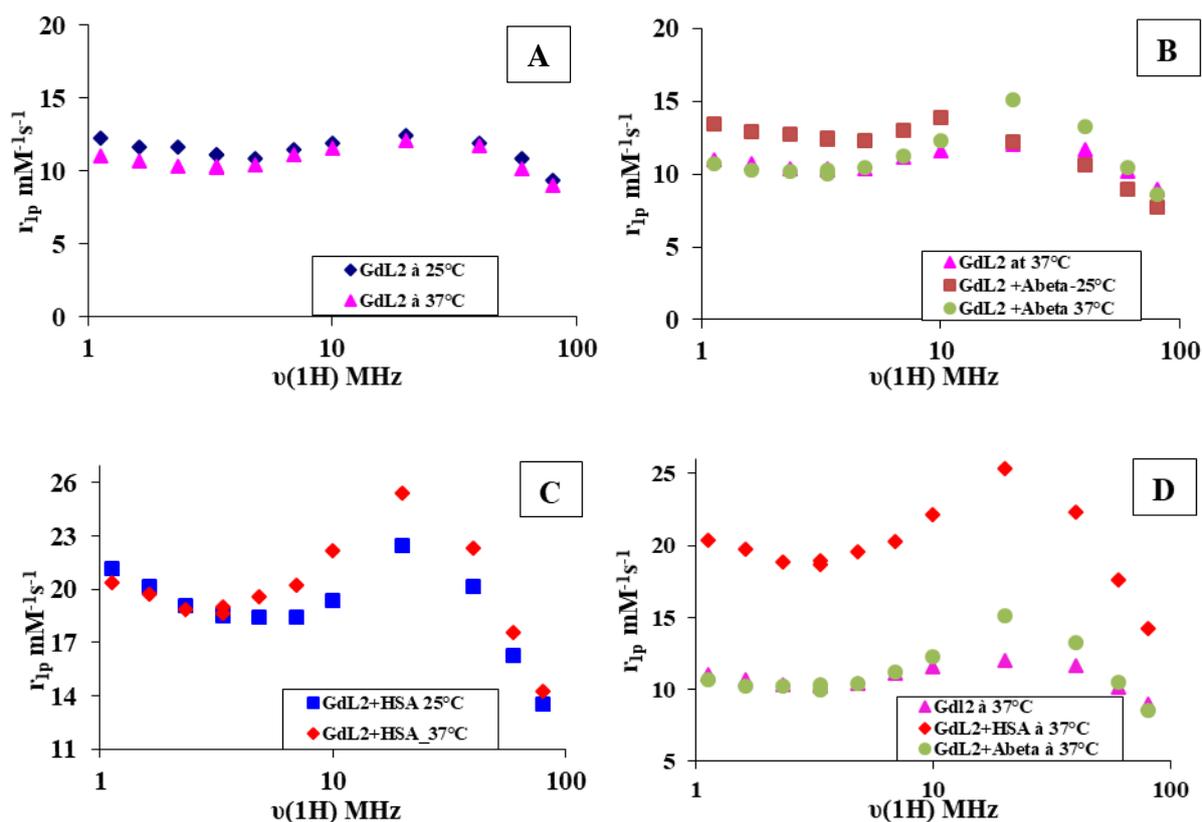


Figure III.22: Profiles ¹H NMRD à 25 et 37°C, pH=7.4, de [GdL2]=0.2mM seul (A), en présence de [Aβ₁₋₄₀]=0.2mM (B), ou de [HSA]=0.6mM (C), et comparaison des profils à 37°C (D).

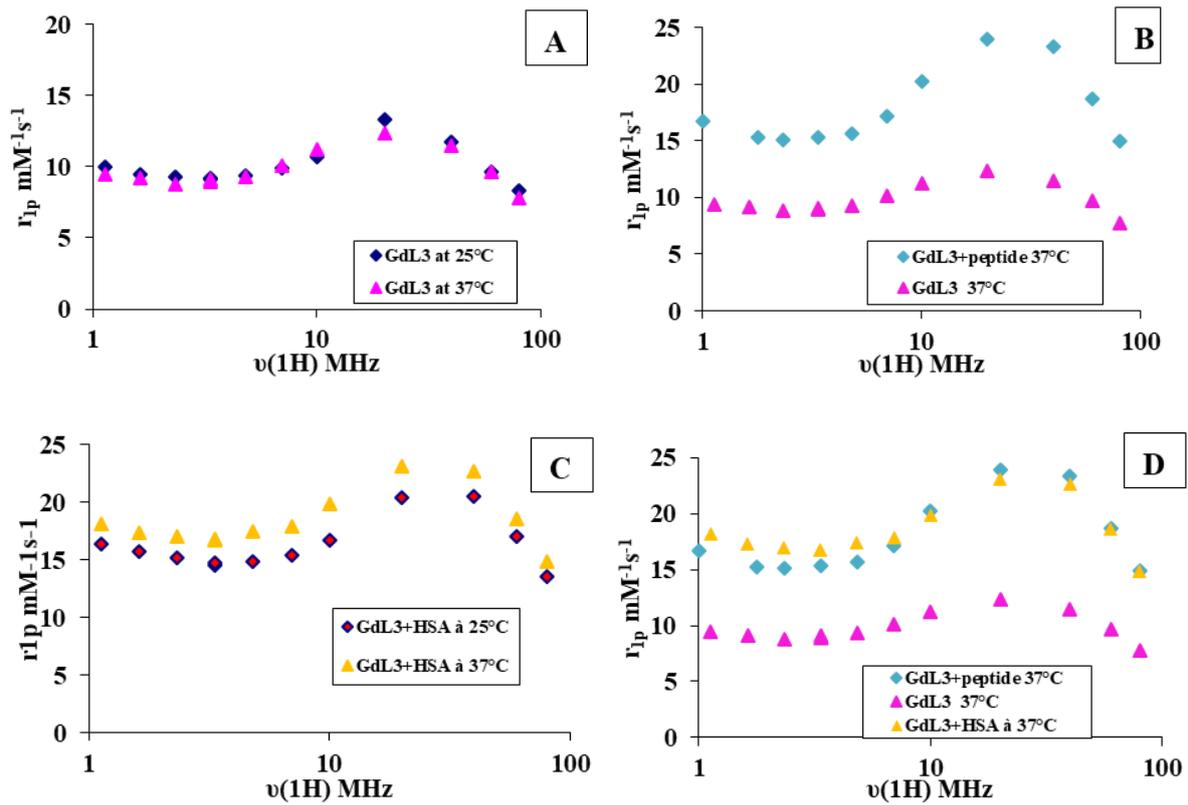


Figure III.23: Profiles ^1H NMRD à 37°C, pH=7.4, de $[\text{GdL3}]=0.25\text{mM}$ seul à 25°C et 37°C (A), $\text{A}\beta_{1-40}=0.22\text{mM}$ en présence de $[\text{GdL3}]=0.225\text{mM}$ à 37°C (B), $[\text{HSA}]=0.6\text{mM}$ en présence de et $[\text{GdL3}]=0.49\text{mM}$ à 25°C et 37°C (C) et une comparaison entre les profils de $[\text{GdL3}]=0.225\text{mM}$ seul et en présence de $[\text{A}\beta_{1-40}]=0.22\text{mM}$ et de la $[\text{HSA}]=0.6\text{mM}+[\text{GdL3}]=0.49\text{mM}$ à 37°C (D).

5. Etude de biodistribution *ex vivo* :

Comme nous avons précisé dans le chapitre introductif, notre équipe, ainsi que plusieurs autres groupes ont travaillé sur la détection des plaques amyloïdes et en particulier de type $\text{A}\beta_{1-40}$. Les études de biodistribution *ex vivo* (par dissection des animaux) ou *in vivo* (par imagerie) représentent souvent la première étape d'une évaluation biologique plus poussée des sondes d'imagerie. Dans l'équipe, des complexes de Gallium-68 ont fait précédemment l'objet d'une étude de biodistribution sur des souris saines et transgéniques APP/PS1 (modèle murin de la maladie d'Alzheimer). Ainsi l'accumulation de $^{68}\text{GaL1}$ au niveau du cerveau et dans d'autres organes a été suivie *in vivo* par imagerie μPET en détectant des courbes d'activités en fonction du temps. A 2 min après injection, la valeur de l'activité PET est de 1.3%ID/cc (en pourcentage de dose injectée par volume) dans le cerveau chez les souris malades, contre $\sim 0.5\%$ ID/cc chez les souris saines, indiquant une concentration plus élevée du complexe dans le cerveau des souris malades. Cette meilleure accumulation est probablement liée à la rupture partielle de la barrière hématoencéphalique dans le cerveau malade.

L'élimination de ce radiotracer des organes richement vascularisés comme les poumons ou le foie est très lente ce qui peut être expliqué par la forte affinité du complexe à la HSA (K_A du GdL1 = $250M^{-1}$)²². Par exemple, l'activité dans le foie augmente pendant la première heure²³ ~7.5 %ID/cc à 5 min et ~17%ID /cc et à 60 min.

Pendant ce travail de thèse, deux ligands, L2 et L3, ont été radiomarqués à l'Indium-111, plus facilement accessible pour nous sur le campus CNRS d'Orléans que le Gallium-68. Les radiocomplexes obtenus ont fait l'objet d'études de biodistribution sur des souris saines de type C57BL6 et ces résultats seront directement comparés à ceux précédemment obtenus avec le complexe analogue $^{111}\text{In}(\text{DO3A-PiB})$ ²⁴ et d'autres complexes métalliques.

Dans ces études de biodistribution *ex vivo*, les molécules marquées à l'Indium-111 ont été injectées dans la souris *via* la veine caudale (injection intraveineuse). Les souris (n=3) ont été sacrifiées 2 et 30 min après l'injection et les organes d'intérêt prélevés. Les résultats obtenus sont présentés dans les graphes suivants (Figure III.24), en pourcentage de dose injectée par poids d'organe (%ID/g \pm SD). Les valeurs des organes d'intérêts sont détaillées dans le tableau III.5 et le reste des valeurs sont présentées dans **annexe 3**.

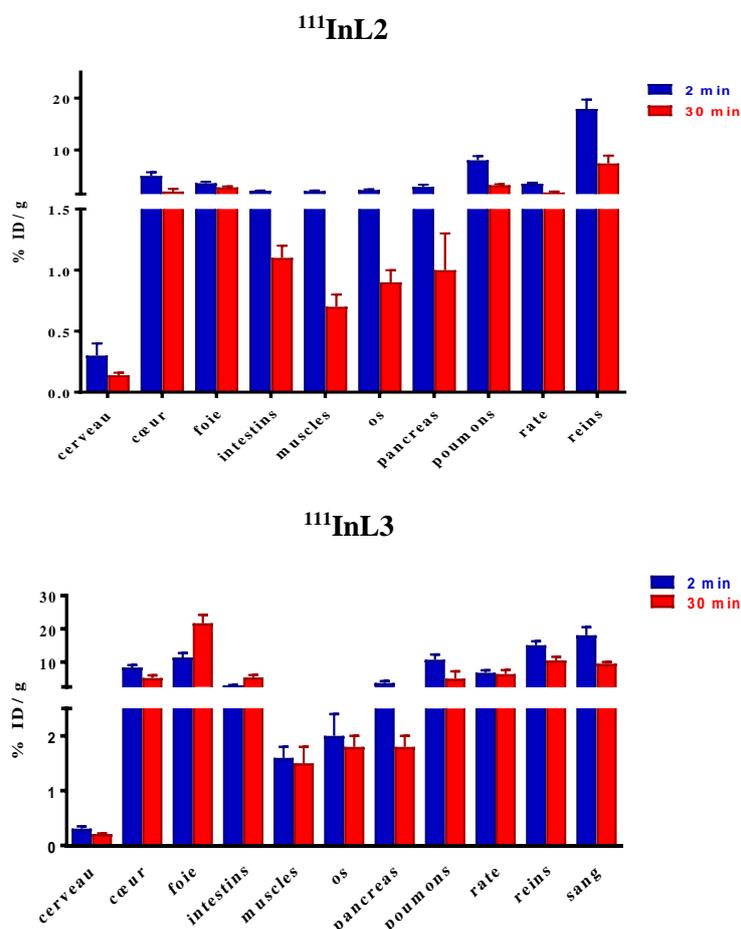


Figure III.24: Biodistribution *ex vivo* de $^{111}\text{InL2}$ et $^{111}\text{InL3}$ dans les organes d'intérêt.

Tableau III.5: Comparaison des résultats de biodistribution en %ID/g de $^{111}\text{InL2}$ et $^{111}\text{InL3}$ dans des souris saines avec quelques exemples de complexes de la littérature en comparaison.

	$^{111}\text{In}(\text{DO3A-PiB})^{24}$ (Figure I.18)		$^{111}\text{InL2}$ (Figure III.1)		$^{111}\text{InL3}$	
	2min	30 min	2min	30min	2min	30min
Cerveau	0.36±0.03	0.11±0.01	0.30±0.10	0.14±0.02	0.31±0.04	0.21±0.01
Pancréas			2.90±0.40	1.00±0.30	3.70±0.60	1.80±0.20
Reins	12.53±1.07	4.23±0.42	17.90±1.80	7.40±1.50	15.10±1.20	10.50±1.10
Foie	4.90±0.12	7.65±1.59	3.60±0.30	2.80±0.20	11.40±1.30	21.70±2.50
Poumons	11.42±0.77	1.44±0.14	8.00±0.80	3.20±0.20	10.70±1.60	5.00±2.20
Os			2.30±0.10	0.90±0.10	2.0±0.4	1.80±0.20
Log P	-0.15		0.63		1.46	

	$\text{Al}^{18}\text{F-NODA}^{25}$ (Figure I.24)		$^{99\text{m}}\text{TcL5}^{26}$ (Figure I.21)	
	2min	30min	2min	30min
Cerveau	0.30±0.04	0.12±0.10	2.11±0.11	1.225±0.13
Pancréas	4.96±0.38	1.20±0.20		
Reins	14.06±1.82	3.46±0.47	21.27±0.88	10.27±1.43
Foie	37.71±3.47	77.17±7.73	26.76±3.82	32.94±4.98
Poumons	15.59±3.18	1.83±0.48	12.28±2.44	4.73±0.83
Os	3.1±40.57	1.38±0.45		
Log P	0.74		1.74	

En vue de la potentielle application de ces molécules pour une détection des peptides amyline et/ou $\text{A}\beta$, nous nous sommes intéressés à leur rétention dans le pancréas et le cerveau. Toutefois, une élimination rapide des composés est attendue. En effet, dans les organes de souris saines, les peptides amyloïdes ne sont pas présents en grande quantité, donc les complexes ne seront pas retenus longtemps, d'où le choix des temps de sacrifice courts. Ces temps nous permettront aussi une comparaison avec d'autres études de biodistribution menées dans l'équipe ainsi qu'avec d'autres sondes publiées.

Nous pouvons conclure des expériences réalisées que le complexe $^{111}\text{InL2}$ est rapidement éliminé, principalement par voie rénale, avec une rétention de 17.9 ± 1.8 %ID/g à 2 min, et ne montre pas une accumulation importante dans d'autres organes. Le complexe $^{111}\text{InL3}$, a une rétention de 15.1 ± 1.2 %ID/g dans les reins, mais présente une accumulation importante dans le foie également. Une accumulation qui augmente avec le temps : 11.4 ± 1.3 et 21.7 ± 2.5 %ID/g à 2 et 30 min respectivement. Une rétention dans la rate et les intestins est aussi plus évidente pour $^{111}\text{InL3}$ et elle augmente au fur et à mesure, contrairement aux résultats obtenus avec $^{111}\text{InL2}$. L'élimination de $^{111}\text{InL3}$ est donc plutôt biliaire/intestinale, contrairement au $^{111}\text{InL2}$

ayant une élimination rénale. Ceci peut être expliqué par le caractère plus lipophile du complexe $^{111}\text{InL3}$ (Log P = 1.46) par rapport à $^{111}\text{InL2}$ (Log P = 0.63).

Pour avoir une idée de la stabilité *in vivo* des complexes, et afin d'exclure une potentielle transmétallation, nous avons vérifié leur accumulation au niveau du muscle et de l'os, deux organes qui ont tendance à stocker le métal libre. En effet, des études de biodistribution effectuées après l'injection du $^{111}\text{InCl}_3^{27}$ ont montré une accumulation de l' ^{111}In « libre » d'environ 20 et 4 fois plus que $^{111}\text{InL2}$ et $^{111}\text{InL3}$, respectivement, à 6h post injection. La faible rétention et l'élimination rapide au cours du temps observé pour les deux complexes montrent une bonne stabilité *in vivo*. Ceci confirme la forte stabilité de ce type de complexe dans le milieu biologique, en toute cohérence avec l'utilisation très répandue des chélateurs de type DO3A-monoamide pour la complexation de l' $^{111}\text{In(III)}$ dans des applications d'imagerie *in vivo*.

En ce qui concerne le pancréas, une accumulation de 2.9 ± 0.4 %ID/g et 3.7 ± 0.6 %ID/g a été obtenue à 2 min après injection avec $^{111}\text{InL2}$ et $^{111}\text{InL3}$, respectivement. Ces résultats laissent espérer des accumulations suffisamment élevées pour une détection en TEMP en cas d'application chez la souris transgénique exprimant l'amyline humaine et cela, avec une rétention sur les plaques amyline.

Dans le cerveau, une accumulation de 0.3-0.4%ID/g a été mesurée 2 minutes après injection pour les 2 complexes $^{111}\text{InL2}$ et $^{111}\text{InL3}$. Cette valeur est similaire à celle obtenue avec $^{111}\text{In(DO3A-PiB)}$ (0.36 ± 0.03 %ID/g) dans le cortex 2 minutes après injection²⁴. Cela semble indiquer que l'augmentation de la lipophilie n'engendre aucune amélioration sur le passage de la BHE et que celui-ci est limité par le poids moléculaire de ces complexes.

Une autre façon de comparer nos résultats avec ceux de la littérature est de déterminer la « clearance », définie par le ratio entre l'accumulation à 2min et 30min d'un organe. Ce paramètre donne une idée du temps que l'agent d'imagerie « passe » dans un organe. L'importance de ce paramètre est liée au fait que ces agents d'imagerie doivent être bien sûr éliminés pour ne pas déclencher une réponse de type immunitaire, mais doivent rester suffisamment de temps pour qu'une acquisition d'image soit réalisée. Par ailleurs, ce paramètre est assez exploité dans le cas de comparaison entre les biodistributions effectuées *in vivo* et en *ex vivo*. Dans ce cas le ratio est plus fiable que de comparer une accumulation obtenue en imagerie *in vivo* par une ROI (%ID par volume de ROI – « region of interest »)

qui ne correspond pas toujours à un %ID par poids d'organe prélevé en entier dans les expériences de biodistribution *ex vivo*.

Le Al¹⁸F-NODA (Figure I.24) présente une accumulation de 4.96%ID/g dans le pancréas à 2 min, plus importante que celle de ¹¹¹InL2, par contre, ils ont un « temps de résidence » dans le pancréas assez proche traduit par une clearance de l'ordre de 4.1 et 2.9 respectivement. Un exemple de complexe de Technétium-99m possédant le même motif du PiB, ^{99m}TcL5 (Figure I.21) présente une accumulation importante au niveau du cerveau, 2.11%ID/g à 2min après injection et 1.22%ID/g à 30min. Par contre, en vue d'une potentielle détection de l'amyline dans le pancréas, pour la majorité des complexes de technétium reportés dans la littérature^{28,26} une accumulation très importante au niveau du foie reste un souci. En effet, les deux organes étant très proches, ceci complique et parfois rend quasi-impossible la distinction du signal au niveau du pancréas.

Il est important de rappeler que nos complexes ont la possibilité de se présenter sur différentes formes en solution et que ceci a une grande influence sur leurs affinités aux peptides amyloïdes. En d'autres termes, la concentration de la solution mère a un effet sur la conformation que le complexe peut avoir, notamment vis-à-vis de la formation d'agrégats de type micellaire. Or, lors du marquage radioactif, si la solution de ligand est sous une structure micellaire, cela aura une influence sur la biodistribution du complexe. Evidemment la concentration du radiométal est très basse, mais les radiomarquages sont souvent réalisés dans des conditions d'excès importants de ligand.

La biodistribution de ¹¹¹InL2 a été précédemment étudié au King's College London (KCL) et le profil de biodistribution a été assez différent (Tableau III.6²⁹). En effet, les résultats ont montré des accumulations plus importantes au niveau du foie, des reins et des poumons, avec une accumulation plus faible au niveau du cerveau. Ces valeurs nous ont mené à comparer les conditions de radiomarquage, et effectivement pour les études au KCL 50µg d'¹¹¹InL2 (V=200µL) ont été injectés, ce qui correspond à une concentration de complexe de 0.3mM donc au-dessus de la CMC, tandis que celle utilisée pour nos études était à 1.9µM ce qui peut conduire aux différences observées. En effet, dans une étude précédente, une variation importante de la biodistribution en fonction de la concentration a été déjà démontrée pour un complexe amphiphile, formant des micelles en solution³⁰. La différence de biodistribution a été attribuée à la présence de structures micellaires ou « prémicellaires » dans la solution, qui varient fortement en fonction de la concentration de la solution utilisée pour la biodistribution.

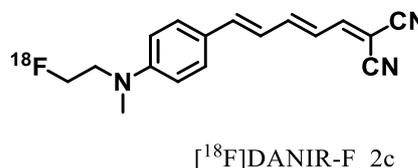
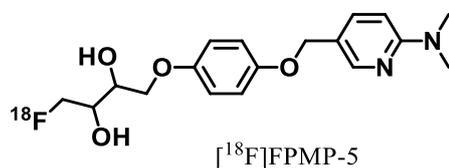
Tableau III.6: Biodistribution en %ID/g de $^{111}\text{InL2}$ (ce travail) *versus* la biodistribution effectuée au KCL à 30 min post injection.

Organe	Ce travail	KCL
Reins	7.4±1.5	74.9
Foie	2.8±0.2	15.3
Poumons	3.2 ± 0.2	13.2
Pancreas	1.0±0.3	--
Cerveau	0.14±0.02	0.05±0.07
Os	0.9±0.1	1.1

Tableau III.7: Biodistribution en %ID/g de deux petites molécules destinées à une détection de l'amyline dans le pancréas.

Le ^{18}F (FPMP-5) présente une accumulation de 6%ID/g 2 minutes après injection au niveau du pancréas avec une clearance de 2.6, similaire à celles obtenues pour $^{111}\text{InL2}$ et $^{111}\text{InL3}$.

	^{18}F (FPMP-5) ³¹		^{18}F (Danir-F 2c) ³²	
	2 min	30 min	2 min	30 min
Cerveau	3.35±0.23	0.92±0.17		
Pancréas	6.00±0.58	2.28±0.53	5.88±0.61	3.09±0.28
Reins	7.03±0.63	8.64±1.45	9.37±0.85	4.38±0.43
Foie	15.02±0.53	13.45±1.34	10.03±1.04	7.52±0.70
Poumons	6.67±0.50	3.34±0.69		
Os	2.67±0.35	2.98±0.24	2.05±0.15	4.36±0.43



Une accumulation assez importante est détectée au niveau du cerveau de 3.35%ID/g 2min après injection. Ceci peut être expliqué par sa structure et à sa masse molaire faible 350g/mol. Une forte accumulation au niveau du foie à 2 minutes après injection, qui ne change pas à 30 min, suggère que la molécule a un caractère lipophile. Comparé aux résultats de biodistribution très récents de ^{18}F (Danir-F)³², l'accumulation au niveau du pancréas reste similaire. Le ^{18}F (Danir-F) s'accumule moins dans le foie et son élimination, par les reins, est plus rapide.

En résumé, les résultats de biodistribution *ex vivo* obtenus avec $^{111}\text{InL2}$ et $^{111}\text{InL3}$ sont prometteurs et permettent d'envisager les études sur des souris transgéniques exprimant l'amyline humaine.

6. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié les interactions entre l'A β ₁₋₄₀ ou l'amyline et nos trois complexes de Gd(III), comportant chacun une seule unité de reconnaissance PiB pour les peptides amyloïdes. Les interactions ont été caractérisées quantitativement par les constantes de dissociation déterminées par SPR (Surface Plasmon Resonance), et qualitativement par des études de dichroïsme circulaire et de relaxométrie. De plus, une étude de biodistribution a été menée sur des souris saines présentant des accumulations assez importantes de ¹¹¹InL2 et ¹¹¹InL3 au niveau du pancréas.

Afin de mieux contrôler l'état d'agrégation des peptides sur les sensorchips de Biacore, nous avons appliqué une méthodologie spécifique de préparation des sensorchips qui consiste à induire l'agrégation directement sur le sensorchip, après l'immobilisation du peptide. C'est une avancée importante par rapport aux études précédentes menées dans l'équipe.

Dans un premier temps, les résultats SPR ont été analysés par un modèle simple Langmuir, supposant une interaction 1 :1 entre le complexe et le peptide. Les constantes de dissociation, K_D , indiquent des affinités globales du même ordre de grandeur, entre 3 et 70 μ M, pour tous les 3 complexes et les deux peptides. On n'observe pas de sélectivité entre l'A β ₁₋₄₀ et l'amyline ; chacun des complexes présente des K_D très similaires pour les deux peptides. Les constantes ne sont pas dépendantes non plus du sens d'attache du dérivé du PiB. Cependant, on note une amélioration systématique de l'affinité globale envers les deux peptides en allongeant le linker ($K_D = 4 \mu$ M pour GdL3 et $K_D = 20 \mu$ M pour GdL2).

Nous avons également poussé les études SPR en augmentant sensiblement le niveau d'immobilisation des sensorchips. Ainsi, les interactions à très basses concentrations, nanomolaires, du complexe devient accessibles à l'étude. Dans ces conditions, aucune interaction supplémentaire n'a été identifiée pour GdL1 et GdL2, mais avec le complexe GdL3, il a été possible de déterminer une constante de dissociation de 4 nM, proche de celle du composé PiB. Cette dernière constante pourrait être caractéristique de l'affinité du composé GdL3 sous sa forme monomérique. Elle montre que si le PiB est séparé du complexe par un espaceur long et hydrophobe comme la chaîne alkyl C10, il est possible de maintenir une affinité élevée aux peptides.

En affinant les résultats obtenus en SPR, il ressort une grande complexité des systèmes étudiés. En effet, en utilisant le modèle de linéarisation selon Scatchard, plusieurs régimes d'interactions, caractérisés par des ruptures de pente et alternant les interactions fortes et faibles, sont détectés en fonction de la concentration. Ces régimes semblent correspondre aux

régimes de concentration identifiés dans les études de caractérisations des complexes GdL1-3 par les techniques optiques que nous avons appliquées pour accéder aux CMCs. En effet, ces différentes caractérisations optiques ont permis d'identifier des changements de structure des complexes en fonction de la concentration.

Ainsi, on peut supposer que lorsque l'on augmente la concentration dans des solutions des complexes métalliques, des structures de plus en plus complexes se forment. Dans ces structures, la partie PiB pourrait être plus ou moins disponible pour interagir avec les peptides amyloïdes, expliquant ainsi les différences d'affinité remarquées.

Ces différents régimes d'interaction ont aussi été observés lors de l'étude de dichroïsme circulaire, utilisée pour suivre l'agrégation des peptides dans le temps et en présence des complexes à différentes concentrations. Ceci est surtout remarquable dans le cas de l'amyline ou les concentrations GdL1-3 de 1.5 et 30 μ M (ratio peptide : complexe de 1 :0.1 et 1 :2) semblent bloquer le processus d'agrégation du peptide dans le cas des 3 complexes. Pour les concentrations 15 et 60 μ M, les résultats varient selon les complexes GdL1, GdL2 et GdL3, avec respectivement peu d'influence, une accélération de l'agrégation et un blocage du processus.

L'influence des complexes sur l'agrégation du peptide A β ₁₋₄₀ est quelque peu différente. Les complexes GdL1 et GdL2 entraînent une agrégation plus rapide alors que l'on semble retrouver des résultats similaires au peptide amyline dans le cas du GdL3, à la différence où les concentrations de complexe entraînant un blocage immédiat de la structure du peptide A β ₁₋₄₀ sont de 25 et 100 μ M.

Ainsi, on peut conclure que l'influence des complexes sur le processus d'agrégation des peptides amyloïdes étudiés dépend de la structure des complexes en solution suivant la concentration, mais aussi du peptide étudié.

L'interaction des complexes avec la HSA a été également étudiée. En relaxométrie, il a été montré une augmentation significative de la relaxivité autour de 20MHz, caractéristique d'une interaction entre la protéine et les complexes. Cette interaction a été également caractérisée en SPR. Ainsi les affinités globales semblent être liées à la lipophilie des complexes. Celui ayant la constante de dissociation la plus élevée ($K_D=1.7$ mM pour GdL1) est celui qui possède le caractère le plus amphiphile ($\log P=0.3$). Lorsque la lipophilie augmente, ($\log P= 0.63$ pour GdL2 et $\log P= 1.46$ pour GdL3), on obtient des constantes de dissociation plus basses (respectivement $K_D=0.11$ mM et $K_D= 0.036$ mM). De plus, dans cette étude aussi, le modèle de Scatchard montre plusieurs régimes d'interaction dans la gamme de concentration étudiée.

Chapitre III : Complexes avec un bras de ciblage

Pour conclure, le complexe GdL3 présente les meilleures propriétés d'affinité envers les peptides amyloïdes et a la plus grande influence sur l'agrégation des peptides puisque, notamment dans le cas de l'amyline, il prolonge la présence du peptide en solution sous une forme soluble. Il conviendra néanmoins, de répéter ces expériences sur un temps plus long pour confirmer ces résultats.

Les résultats de biodistribution *ex vivo* obtenus sur souris normales indiquent une différence majeure entre les deux complexes étudiés. $^{111}\text{InL2}$ s'élimine par voie rénale, tandis que le $^{111}\text{InL3}$, plus lipophile, s'élimine par voie intestinale/biliaire. Leur accumulation dans le pancréas est relativement élevée et permet d'envisager la continuation des études *in vivo* sur des souris modèles exprimant l'amyline humaine.

7. Bibliographie

- (1) Kragh-Hansen, U.; Chuang, V. T. G.; Otagiri, M. Practical Aspects of the Ligand-Binding and Enzymatic Properties of Human Serum Albumin. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25* (6), 695–704. <https://doi.org/10.1248/bpb.25.695>.
- (2) Brogioni, B.; Berti, F. Surface Plasmon Resonance for the Characterization of Bacterial Polysaccharide Antigens: A Review. *Med. Chem. Commun.* **2014**, *5* (8), 1058–1066. <https://doi.org/10.1039/C4MD00088A>.
- (3) Stenberg, E.; Persson, B.; Roos, H.; Urbaniczky, C. Quantitative Determination of Surface Concentration of Protein with Surface Plasmon Resonance Using Radiolabeled Proteins. *Journal of Colloid and Interface Science* **1991**, *143* (2), 513–526. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(91\)90284-F](https://doi.org/10.1016/0021-9797(91)90284-F).
- (4) Lee, W.; Jung, H.; Son, M.; Lee, H.; Kwak, T. J.; Lee, G.; Kim, C. H.; Lee, S. W.; Yoon, D. S. Characterization of the Regrowth Behavior of Amyloid-like Fragmented Fibrils Decomposed by Ultrasonic Treatment. *RSC Adv.* **2014**, *4* (100), 56561–56566. <https://doi.org/10.1039/C4RA08270B>.
- (5) Braˆnnstroˆm, K.; Gharibyan, A. L.; Islam, T.; Iakovleva, I.; Nilsson, L.; Lee, C. C.; Sandblad, L.; Pamren, A.; Olofsson, A. Scanning Electron Microscopy as a Tool for Evaluating Morphology of Amyloid Structures Formed on Surface Plasmon Resonance Chips. *Data in Brief* **2018**, *19*, 1166–1170. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.05.129>.
- (6) Martins, A. F.; Dias, D. M.; Morfin, J.-F.; Lacerda, S.; Laurents, D. V.; Tóth, É.; Geraldés, C. F. G. C. Interaction of PiB-Derivative Metal Complexes with Beta-Amyloid Peptides: Selective Recognition of the Aggregated Forms. *Chemistry - A European Journal* **2015**, *21* (14), 5413–5422. <https://doi.org/10.1002/chem.201406152>.
- (7) Eng, L.; Nygren-Babol, L.; Hanning, A. Label-Enhanced Surface Plasmon Resonance Applied to Label-Free Interaction Analysis of Small Molecules and Fragments. *Analytical Biochemistry* **2016**, *510*, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.06.008>.
- (8) Bort, G.; Catoen, S.; Borderies, H.; Keksi, A.; Ballet, S.; Louin, G.; Port, M.; Ferroud, C. Gadolinium-Based Contrast Agents Targeted to Amyloid Aggregates for the Early Diagnosis of Alzheimer’s Disease by MRI. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *87*, 843–861. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.016>.
- (9) Yoshimura, M.; Ono, M.; Watanabe, H.; Kimura, H.; Saji, H. Development of 99mTc-Labeled Pyridyl Benzofuran Derivatives To Detect Pancreatic Amylin in Islet Amyloid Model Mice. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (6), 1532–1539. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00174>.
- (10) Bjellqvist, B.; Hughes, G. J.; Pasquali, C.; Paquet, N.; Ravier, F.; Sanchez, J. C.; Frutiger, S.; Hochstrasser, D. The Focusing Positions of Polypeptides in Immobilized PH Gradients Can Be Predicted from Their Amino Acid Sequences. *Electrophoresis* **1993**, *14* (10), 1023–1031. <https://doi.org/10.1002/elps.11501401163>.
- (11) Wahlström, A.; Hugonin, L.; Perálvarez-Marín, A.; Jarvet, J.; Gräslund, A. Secondary Structure Conversions of Alzheimer’s A β (1-40) Peptide Induced by Membrane-Mimicking Detergents: Detergent-Induced A β (1-40) Secondary Structures. *FEBS Journal* **2008**, *275* (20), 5117–5128. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06643.x>.
- (12) Sun, Q.; Zhao, J.; Zhang, Y.; Yang, H.; Zhou, P. A Natural Hyperbranched Proteoglycan Inhibits IAPP Amyloid Fibrillation and Attenuates β -Cell Apoptosis. *RSC Adv.* **2016**, *6* (107), 105690–105698. <https://doi.org/10.1039/C6RA23429A>.
- (13) Ma, K.; Clancy, E. L.; Zhang, Y.; Ray, D. G.; Wollenberg, K.; Zagorski, M. G. Residue-Specific PKa Measurements of the β -Peptide and Mechanism of PH-Induced Amyloid Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (38), 8698–8706. <https://doi.org/10.1021/ja990864o>.
- (14) Hou, L.; Shao, H.; Zhang, Y.; Li, H.; Menon, N. K.; Neuhaus, E. B.; Brewer, J. M.; Byeon, I.-J. L.; Ray, D. G.; Vitek, M. P.; Iwashita, T.; Makula, R. A.; Przybyła, A. B.; Zagorski, M. G. Solution

- NMR Studies of the A β (1–40) and A β (1–42) Peptides Establish That the Met35 Oxidation State Affects the Mechanism of Amyloid Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (7), 1992–2005. <https://doi.org/10.1021/ja036813f>.
- (15) Danielsson, J.; Jarvet, J.; Damberg, P.; Gräslund, A. The Alzheimer Beta-Peptide Shows Temperature-Dependent Transitions between Left-Handed 3-Helix, Beta-Strand and Random Coil Secondary Structures. *FEBS J.* **2005**, *272* (15), 3938–3949. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04812.x>.
- (16) Danielsson, J.; Jarvet, J.; Damberg, P.; Gräslund, A. Translational Diffusion Measured by PFG-NMR on Full Length and Fragments of the Alzheimer A β (1–40) Peptide. Determination of Hydrodynamic Radii of Random Coil Peptides of Varying Length. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2002**, *40* (13), S89–S97. <https://doi.org/10.1002/mrc.1132>.
- (17) Montalto, M. C.; Farrar, G.; Hehir, C. T. Fibrillar and Oligomeric β -Amyloid as Distinct Local Biomarkers for Alzheimer’s Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2007**, *1097* (1), 239–258. <https://doi.org/10.1196/annals.1379.023>.
- (18) Hayden, M. R.; Tyagi, S. C.; Kerklo, M. M.; Nicolls, M. R. Type 2 Diabetes Mellitus as a Conformational Disease. **16**.
- (19) Suzuki, Y.; Brender, J. R.; Hartman, K.; Ramamoorthy, A.; G. Marsh, E. N. Alternative Pathways of Human Islet Amyloid Polypeptide Aggregation Distinguished by 19F NMR-Detected Kinetics of Monomer Consumption. *Biochemistry* **2012**, *51* (41), 8154–8162. <https://doi.org/10.1021/bi3012548>.
- (20) Suzuki, Y.; Brender, J. R.; Soper, M. T.; Krishnamoorthy, J.; Zhou, Y.; Ruotolo, B. T.; Kotov, N. A.; Ramamoorthy, A.; Marsh, E. N. G. Resolution of Oligomeric Species during the Aggregation of A β 1-40 Using 19F NMR. *Biochemistry* **2013**, *52* (11), 1903–1912. <https://doi.org/10.1021/bi400027y>.
- (21) Brender, J. R.; Krishnamoorthy, J.; Sciacca, M. F. M.; Vivekanandan, S.; D’Urso, L.; Chen, J.; La Rosa, C.; Ramamoorthy, A. Probing the Sources of the Apparent Irreproducibility of Amyloid Formation: Drastic Changes in Kinetics and a Switch in Mechanism Due to Micellelike Oligomer Formation at Critical Concentrations of IAPP. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119* (7), 2886–2896. <https://doi.org/10.1021/jp511758w>.
- (22) Martins, A. F.; Morfin, J.-F.; Geraldes, C. F. G. C.; Tóth, É. Gd³⁺ Complexes Conjugated to Pittsburgh Compound B: Potential MRI Markers of β -Amyloid Plaques. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2014**, *19* (2), 281–295. <https://doi.org/10.1007/s00775-013-1055-8>.
- (23) Cressier, D.; Dhilly, M.; Cao Pham, T. T.; Fillesoye, F.; Gourand, F.; Maïza, A.; Martins, A. F.; Morfin, J.-F.; Geraldes, C. F. G. C.; Tóth, É.; Barré, L. Gallium-68 Complexes Conjugated to Pittsburgh Compound B: Radiolabeling and Biological Evaluation. *Molecular Imaging and Biology* **2016**, *18* (3), 334–343. <https://doi.org/10.1007/s11307-015-0906-9>.
- (24) Martins, A. F.; Morfin, J.-F.; Kubíčková, A.; Kubíček, V.; Buron, F.; Suzenet, F.; Salerno, M.; Lazar, A. N.; Duyckaerts, C.; Arlicot, N.; Guilloteau, D.; Geraldes, C. F. G. C.; Tóth, É. PiB-Conjugated, Metal-Based Imaging Probes: Multimodal Approaches for the Visualization of β -Amyloid Plaques. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4* (5), 436–440. <https://doi.org/10.1021/ml400042w>.
- (25) Song, J.; Peng, X.; Li, L.; Yang, F.; Zhang, X.; Zhang, J.; Dai, J.; Cui, M. Al18F-NODA Benzothiazole Derivatives as Imaging Agents for Cerebrovascular Amyloid in Cerebral Amyloid Angiopathy. *ACS Omega* **2018**, *3* (10), 13089–13096. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01120>.
- (26) Zhang, X.; Yu, P.; Yang, Y.; Hou, Y.; Peng, C.; Liang, Z.; Lu, J.; Chen, B.; Dai, J.; Liu, B.; Cui, M. 99mTc-Labeled 2-Arylbzothiazoles: A β Imaging Probes with Favorable Brain Pharmacokinetics for Single-Photon Emission Computed Tomography. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (10), 2493–2504. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00444>.

- (27) Dassin, E.; Eberlin, A.; Briere, J.; Dosne, A. M.; Najean, Y. Metabolic Fate of ¹¹¹Indium in the Rat. *International Journal of Nuclear Medicine and Biology* **1978**, *5* (1), 34–37. [https://doi.org/10.1016/0047-0740\(78\)90089-X](https://doi.org/10.1016/0047-0740(78)90089-X).
- (28) Yoshimura, M.; Ono, M.; Watanabe, H.; Kimura, H.; Saji, H. Development of ^{99m}Tc-Labeled Pyridyl Benzofuran Derivatives To Detect Pancreatic Amylin in Islet Amyloid Model Mice. *Bioconjugate Chemistry* **2016**, *27* (6), 1532–1539. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00174>.
- (29) Costa, P. M.; Wang, J. T.-W.; Morfin, J.-F.; Khanum, T.; To, W.; Sosabowski, J.; Tóth, E.; Al-Jamal, K. T. Functionalised Carbon Nanotubes Enhance Brain Delivery of Amyloid-Targeting Pittsburgh Compound B (PiB)-Derived Ligands. *Nanotheranostics* **2018**, *2* (2), 168–183. <https://doi.org/10.7150/ntno.23125>.
- (30) Torres, S.; Prata, M. I. M.; Santos, A. C.; André, J. P.; Martins, J. A.; Helm, L.; Tóth, É.; García-Martín, M. L.; Rodrigues, T. B.; López-Larrubia, P.; Cerdán, S.; Geraldes, C. F. G. C. Gd(III)-EPTPAC16, a New Self-Assembling Potential Liver MRI Contrast Agent: In Vitro Characterization and in Vivo Animal Imaging Studies. *NMR in Biomedicine* **2008**, *21* (4), 322–336. <https://doi.org/10.1002/nbm.1194>.
- (31) Watanabe, H.; Yoshimura, M.; Sano, K.; Shimizu, Y.; Kaide, S.; Nakamoto, Y.; Togashi, K.; Ono, M.; Saji, H. Characterization of Novel ¹⁸F-Labeled Phenoxyethylpyridine Derivatives as Amylin Imaging Probes. *Mol. Pharmaceutics* **2018**, *15* (12), 5574–5584. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00756>.
- (32) Watanabe, H.; Kawano, K.; Shimizu, Y.; Iikuni, S.; Nakamoto, Y.; Togashi, K.; Ono, M. Development of Novel PET Imaging Probes for Detection of Amylin Aggregates in the Pancreas. *Mol. Pharmaceutics* **2020**, *17* (4), 1293–1299. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b01309>.

Chapitre IV :

Complexes avec deux bras de ciblage-

Synthèse, caractérisation et étude d'interactions avec des peptides amyloïdes

1. Introduction

Dans le but d'améliorer les affinités des complexes vis-à-vis l'A β ₁₋₄₀ et l'amyline, nous avons développé deux nouvelles molécules portant une unité ciblante supplémentaire. Nous nous sommes basé sur l'exemple de Qin et al.¹ qui ont étudié l'affinité à l'A β ₁₋₄₀ de plusieurs dimères de Thioflavin T conjugués via des espaceurs alkyle ou polyéthylène glycol.

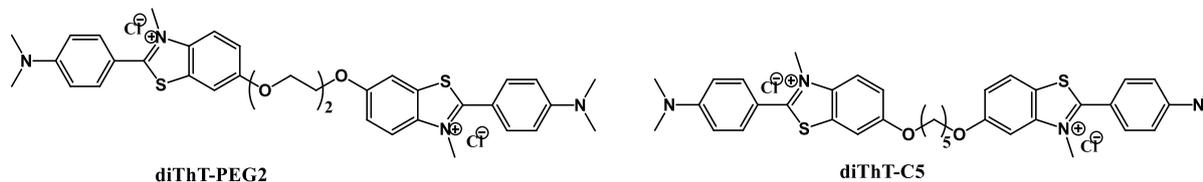


Figure IV.1: Structures chimiques du diThT-PEG2 et diThT-C5¹.

Les K_D sont déterminées par la méthode de titration par fluorescence et comparées à la valeur de K_D correspondante à un monomère de ThT de 2.3 μ M obtenue avec cette méthode et concordante avec la littérature^{2,3}. Les différents motifs dimères di-ThT-PEG présentent des K_D ~20 à 70 fois moins élevé (0.11 à 0.034 μ M) que la constante de dissociation du monomère. Le dimère di-ThT-C5 présente un K_D de 0.102 μ M ce qui a été expliqué par le fait que le linker à 5 chaînons est enfoui dans la structure en feuillet du peptide ce qui génère une distorsion au niveau de la géométrie du di-ThT qui interagit avec le peptide. En termes de spécificité, les deux types de dimère di-ThT-PEG et di-ThT-C5 ont une sensibilité à la détection du peptide amyloïde par rapport au sérum bovine. Le gain en affinité pour les dimères est attribué à la réduction de l'entropie lors de l'interaction, grâce la multivalence des unités de ciblage⁴.

Dans notre cas, la comparaison entre dimères et monomères est plus compliquée. Les principales différences sont que nos complexes de gadolinium ont une structure pré-organisées, forment des micelles de par leur caractère amphiphile et ils possèdent une taille plus importante (Chapitre II).

En tenant compte du gain de l'affinité obtenu avec le dimère de ThT et les résultats du chapitre précédent sur la structure des complexes GdL2 et GdL3, nous avons remplacé un groupement acétate par un second bras de ciblage identique au premier. Ces ligands sont ainsi de type DO2A-diamide mais, comme il est montré sur la figure IV.1, deux structures sont envisageables : une première où les deux bras portant le dérivé du PiB sont introduits de manière adjacente (*cis*) et une deuxième où ils sont opposés (*trans*). L'espaceur choisi entre l'unité ciblante et la partie complexante est la chaîne alkyle à 6 carbones présentée auparavant

dans L2. En effet, bien que le complexe GdL3 ait montré une affinité supérieure, nous avons noté une grande différence de solubilité entre GdL2 et GdL3. C'est pourquoi, il nous a semblé plus judicieux de nous baser sur la structure de GdL2 puisque l'introduction d'un second bras ciblant, devrait abaisser la solubilité des complexes dans l'eau.

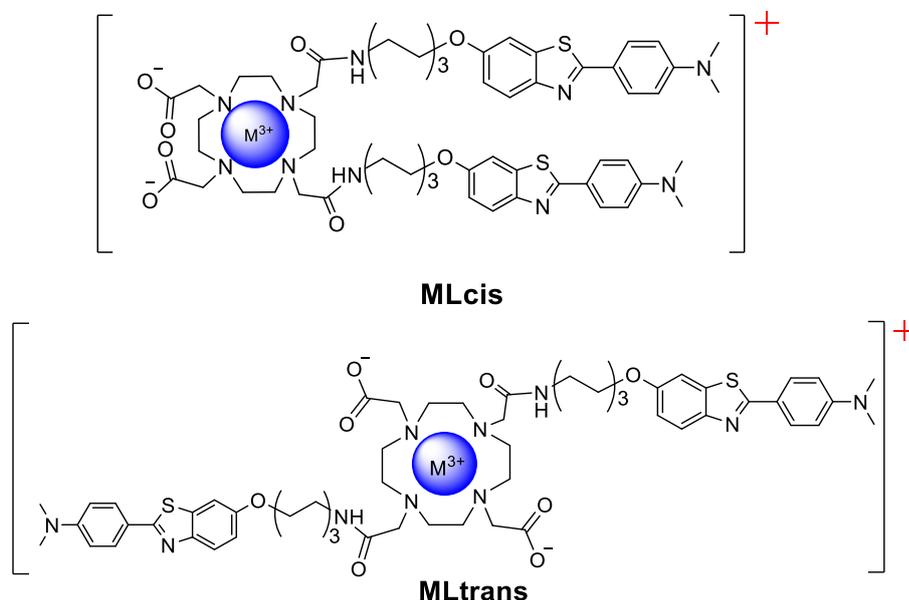


Figure IV.1 : Structure des complexes *MLtrans* et *MLcis*.

Ce type de structure va entraîner plusieurs changements notables par rapport aux complexes GdL1-3. En effet, la charge globale des complexes sera positive, ce qui aura une incidence sur les interactions avec les peptides amyloïdes. Des études ont déjà montré que les charges négatives sont gênantes au niveau de l'interaction entre complexes et plaques amyloïdes⁵ et que les charges positives permettent une interaction avec les membranes biologiques.

D'autre part, avec deux chaînes alkyles de 6 chaînons, nous nous attendons à une lipophilie plus importante par rapport à celle obtenue avec les complexes ayant une seule unité ciblante. Par conséquent, la formation des micelles devrait changer à des concentrations encore plus faibles et présentera éventuellement des conséquences sur la biodistribution et surtout sur le passage par les barrières biologiques.

Dans ce chapitre, nous allons tout d'abord énumérer les différentes voies de synthèse des ligands *cis* et *trans*. Ensuite, nous étudierons le comportement des complexes en solution en comparant avec les résultats du chapitre II. Ensuite, nous allons étudier l'interaction et l'affinité de ces complexes aux peptides amyloïdes. Enfin, nous analyserons l'influence des complexes sur le processus d'agrégation en comparant avec les résultats du chapitre III.

2. Synthèse des complexes GdLcis et GdLtrans

Le cyclen possède 4 fonctions amines secondaires de réactivité équivalente. Ainsi, la N-fonctionnalisation sélective du cyclen est un challenge synthétique intéressant depuis 1980⁶. Plusieurs méthodes ont été décrites pour la mono-alkylation^{7,8}. Dans cette partie, nous allons nous attarder sur quelques méthodes qui permettent d'obtenir une fonctionnalisation régiosélective *cis* (position 1-4 du cyclen) ou *trans* (position 1-7 du cyclen), et notamment celles permettant d'aboutir aux régioisomères du DO2A-*t*Bu (Figure IV.2).

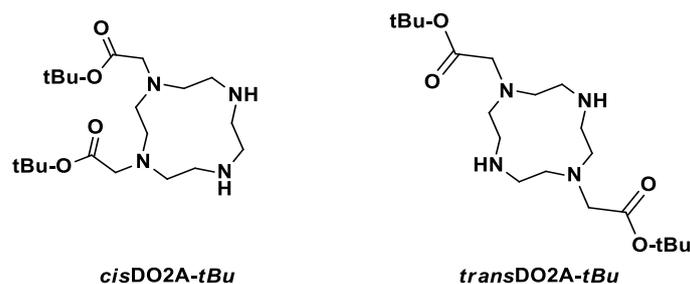


Figure IV.2: Intermédiaires *trans*DO2A-*t*Bu et *cis*DO2A-*t*Bu

2.1 Stratégies d'alkylation en position *cis*

2.1.1 Utilisation d'une protection temporaire

La première méthode que nous allons évoquer est une protection temporaire de type oxamide. Une réaction entre le cyclen et l'oxalate de diéthyle permet d'obtenir ce composé de manière quasi-quantitative. La protection oxamide s'insère parfaitement dans le cyclen, ce qui a été confirmé par des calculs de modélisation⁹. Ainsi, les doublets non liants des atomes d'azotes en position 1-4 sont délocalisés dans les fonctions amides, ce qui permet de réaliser l'alkylation des deux autres fonctions amines secondaires disponibles (Figure IV.3). Il faut cependant noter que le cyclen oxamide est très stable et que son clivage nécessite des conditions basiques assez dures. Il convient donc d'insérer, lors de l'étape de SN2, des groupements résistants dans ces conditions. Dans l'exemple mentionné ici, un second groupe protecteur de type benzyle a été introduit. Ce groupe est intéressant car il est robuste au clivage du pont oxamide, et les esters *tert*-butyle peuvent ensuite être insérés. Le DO2A-*t*Bu *cis* est alors obtenu suite à la déprotection du benzyle par hydrogénation.

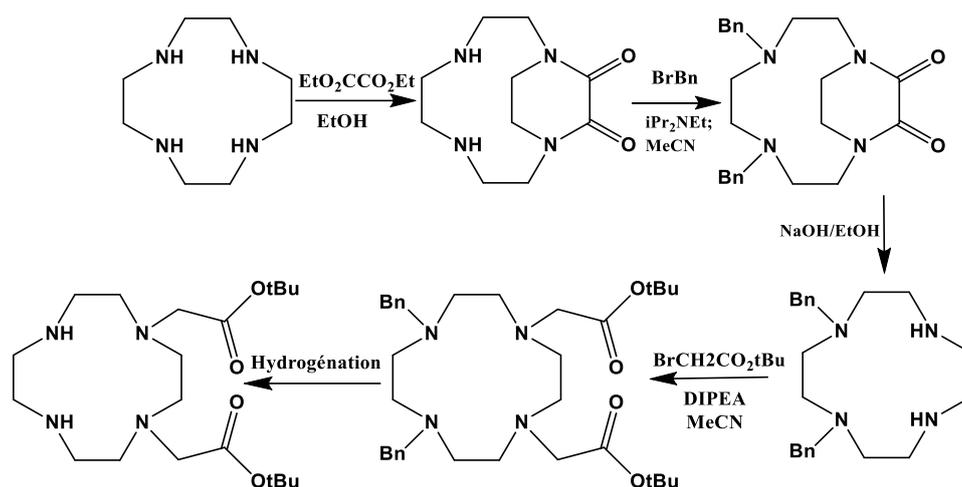


Figure IV.3: Synthèse du DO2A-*t*Bu *cis*¹⁰.

Cette méthode permet d'obtenir exclusivement le DO2A-*t*Bu *cis* mais son principal inconvénient est le nombre important d'étapes qu'elle nécessite, même si elles présentent chacune des rendements élevés.

2.1.2 Alkylation statistique directe

La deuxième stratégie est composée de moins d'étapes, il s'agit d'une méthode d'alkylation statistique directe du cyclen. L'utilisation de conditions particulières permet d'obtenir le composé désiré en une étape avec un rendement décrit de 84% ¹¹ (Figure IV.4). L'emploi d'un solvant apolaire et aprotique, en présence de triméthylamine ralentit fortement les échanges de protons. Le cyclen adopte alors une structure où les doublets non liants des atomes d'azotes en position 1-4 sont plus accessibles. La régiosélectivité 1-4 est alors supérieure à 99%. Il a été montré que l'emploi de solvants polaire-protique (DMF) ou polaire-protique (méthanol) provoque l'augmentation du pourcentage du composé di-substitué en position 1-7 et augmente également la proportion du composé tri-substitué.

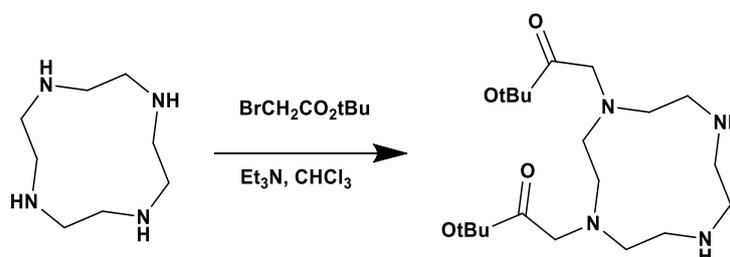


Figure IV.4: Stratégie de synthèse directe du 1,4-Bis(*tert*-butoxycarbonylméthyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododécane.

Les majeurs avantages de cette méthode sont que l'on obtient le composé DO2A-*t*Bu *cis* en une étape, avec un rendement correct et sans présence de DO2A-*t*Bu *trans*. Néanmoins, la difficulté de cette voie de synthèse réside dans la purification où il est parfois difficile d'isoler un composé di-substitué d'un mono ou d'un tri-substitué.

2.2 Stratégies d'alkylation en position *trans*

Pour la synthèse du DO2A-*t*Bu *trans*, il n'y a pas de méthode d'alkylation directe décrite dans la littérature. En effet, nous avons vu que des conditions apolaires-aprotiques pouvaient conduire uniquement au composé *cis*, mais l'augmentation de la polarité et/ou l'emploi d'un solvant protique conduisent à un mélange de régioisomères impossible de purifier.

2.2.1 Variation du pH

Dean Sherry¹² et ses collaborateurs se sont focalisés sur une stratégie particulière pour améliorer la régiosélectivité dans la di-fonctionnalisation du cyclen. Cette stratégie est basée sur les constantes de protonation des fonctions amines du cyclen, celles-ci ayant des valeurs respectives 10.5, 9.5, 1.6 et 0.8¹³. A un pH très acide (2-3), deux fonctions amines secondaires en position 1-7 sont protonnées et donc peu réactives. Une protection exclusive des fonctions amines restantes, sous forme de carbamate, devient alors possible avec 95% de rendement (Figure IV.5). La suite est l'introduction des groupes acétate de *tert*-butyle sur les fonctions amines non protégées dans des conditions classiques d'alkylation. Le composé DO2A-*t*Bu *trans* est enfin obtenu après déprotection des groupes protecteurs par hydrogénation.

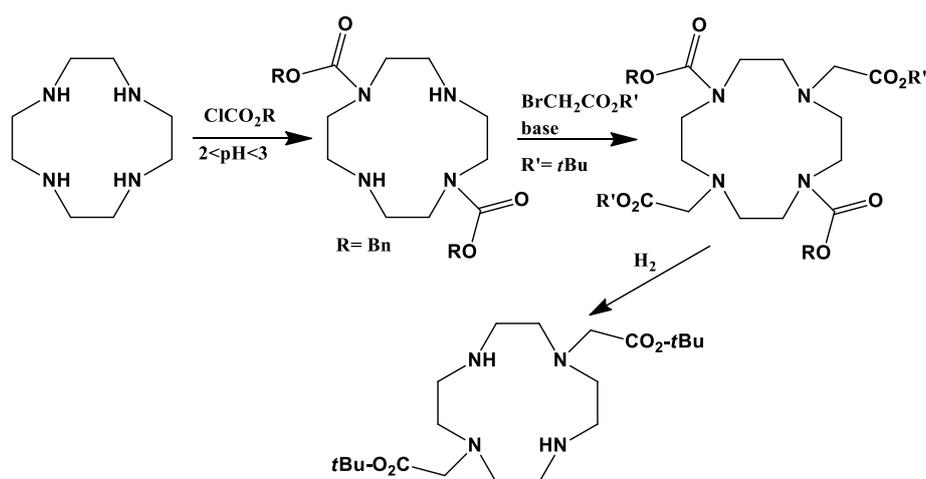


Figure IV.5: Di-N-fonctionnalisation du cyclen en *trans*

2.2.2 Stratégie « bisaminal »

La deuxième stratégie se base sur un intermédiaire « bisaminal »^{14,15}. Un composé est dit bisaminal quand deux fonctions amines sont reliées entre-elles par une liaison covalente suite à une condensation d'un dérivé dicarboxylé (glyoxal) sur une tétramine.

Les structures bisaminales possèdent une structure concave (Figure IV.6), deux doublets non liants des atomes d'azotes en *exo* (face convexe), stériquement plus disponible et plus nucléophiles que les doublets *endo* (face concave), d'où la particularité de formation de l'isomère *trans*.

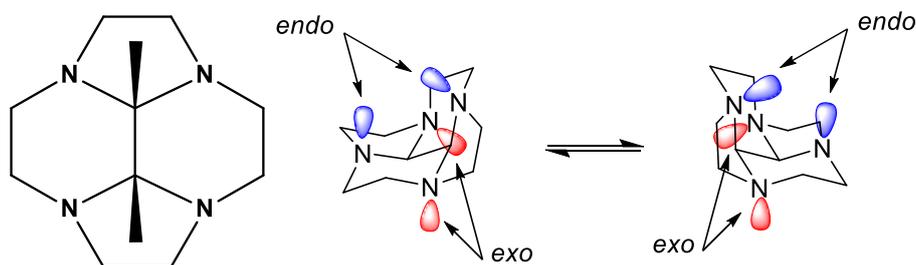


Figure IV.6: Localisation des doublets non liants des atomes d'azote sur le cyclen glyoxal

Selon les résultats des calculs par modélisation moléculaire, les doublets *endo* sont moins disponibles puisqu'elles participent à la liaison C-C du pont aminal. Les atomes d'azote en *trans* peuvent subir des attaques électrophiles sur leurs doublets en *exo*. Suivant les conditions de solvants, il est possible de fonctionnaliser 1 ou 2 fois l'intermédiaire bisaminal. En effet, on obtient des composés ammoniums peu solubles dans les solvants aprotiques, et selon la polarité du milieu, le mono ou le di-fonctionnalisé précipite. Dans les exemples présentés, l'acétonitrile est utilisé.

Deux stratégies ont été développées pour synthétiser le DO2A-*t*Bu *trans* via un intermédiaire bisaminal^{16,17} (Figure IV.7). La première consiste à, comme lors de la protection oxamide du paragraphe précédent, introduire tout d'abord deux groupes protecteurs benzyle résistants aux conditions classiques de clivage du pont glyoxal (soude ou hydrate d'hydrazine à chaud). Ensuite, deux bras acétate de *tert*-butyle sont introduits sur les amines secondaires obtenues et, après hydrogénation, le composé DO2A-*t*Bu *trans* est obtenu avec un rendement global décrit de 67%.

La seconde stratégie (voie B), développée par Oukhtar *et al.*¹⁷ consiste à introduire directement les bras sur le cyclen glyoxal. La particularité de cette méthode est la déprotection

du pont, effectuée de façon plus douce et quantitative en utilisant l'*o*-phenylenediamine ou l'éthylenediamine. Le rendement global est de 93%.

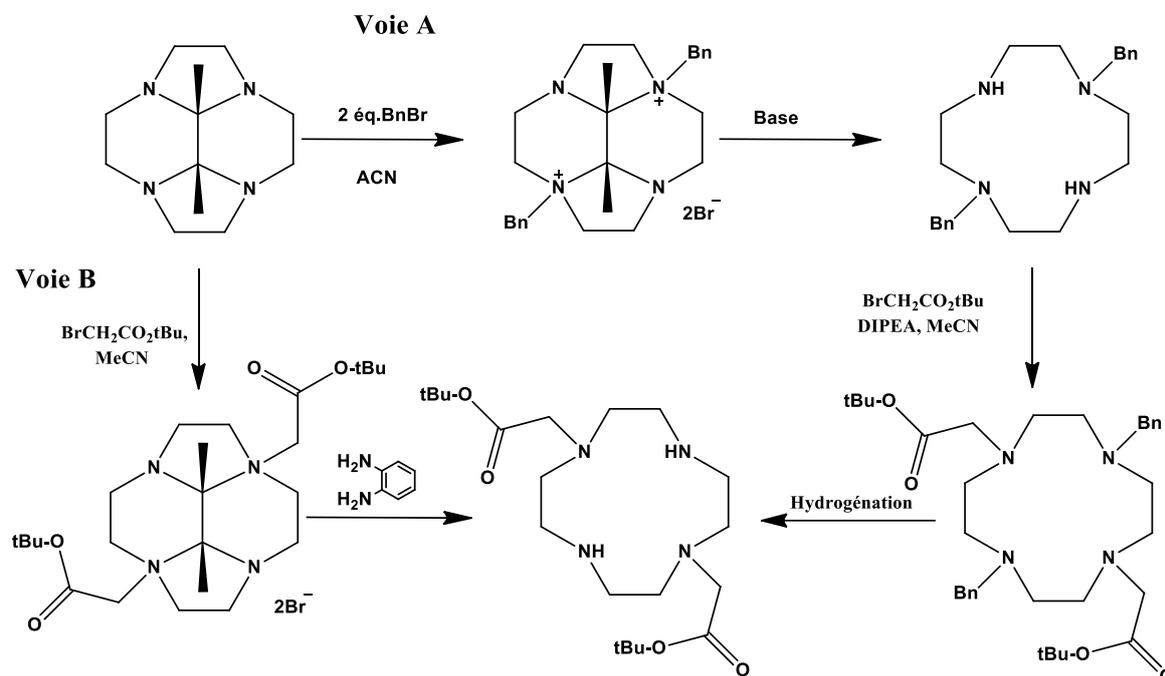


Figure IV.7: Stratégies de synthèse de DO2A-tBu trans par le biais d'un pont glyoxal¹⁸.

La voie B nécessite deux étapes de moins et présente un rendement supérieur. Cependant, les auteurs ont noté qu'elle n'était applicable uniquement sur une échelle de 100-500mg, contrairement à la voie A qui peut être appliquée sur une quantité beaucoup plus importante.

3. Synthèse des complexes

En ce qui concerne la synthèse du ligand *Lcis*, nous avons synthétisé le DO2A-tBu cis suivant la stratégie d'alkylation statistique décrite dans le paragraphe 2.1.2. Ce composé a été obtenu avec 70% de rendement. Ensuite nous avons procédé à l'introduction des bras (10) décrit dans le chapitre II (paragraphe 2.2, schéma II.2), puis à la déprotection des esters afin d'obtenir le ligand *Lcis*. La séparation des différentes étapes d'alkylations s'est avérée extrêmement difficile, faisant chuter le rendement global des réactions à 1.3%.

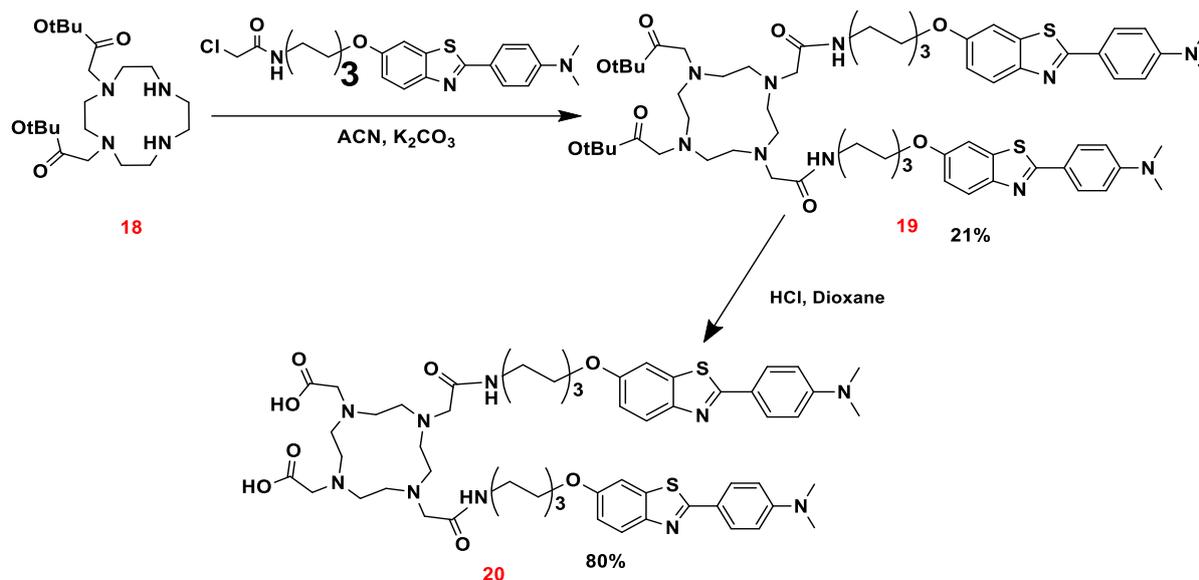


Schéma IV.1: Schéma de synthèse du ligand *Lcis*.

En ce qui concerne la synthèse du ligand *Ltrans*, nous avons utilisé un lot de DO2A-*tBu trans* qui avait été synthétisé au laboratoire suivant la stratégie bisaminal illustré par la voie A (figure IV.7). Ensuite, le même enchainement synthétique que pour *Lcis* a été réalisé. Le ligand *Ltrans* a été obtenu avec un rendement global de 3%.

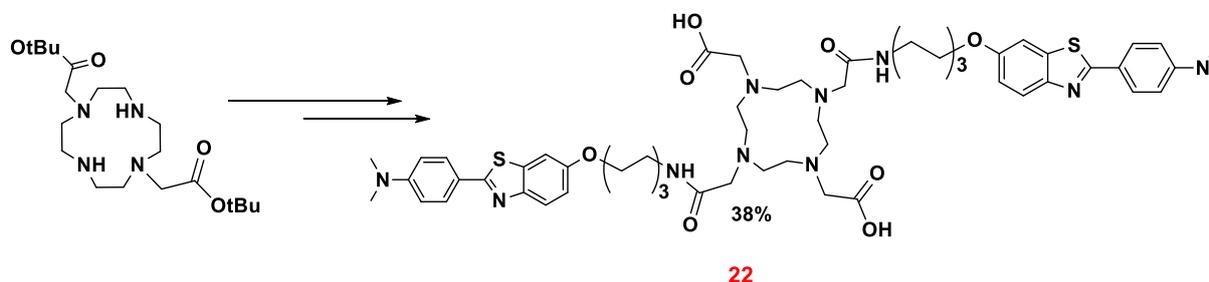


Schéma IV.2: Schéma de synthèse du Ligand *Ltrans*

Les complexes métalliques Gd*Lcis* et Gd*Ltrans*, qui seront étudiés par la suite, ont été préparés de façon similaire à ceux présentés dans le chapitre II.

4. Caractérisation physico-chimique des complexes

Les mêmes techniques évoquées dans les deux chapitres précédents seront utilisées pour caractériser les complexes de deuxième génération.

4.1 Coefficient de partition, Log P

Nous avons commencé par la détermination du caractère hydrophile/lipophile des complexes GdLcis et GdLtrans. Cependant, ces complexes ont montré une solubilité très limitée en milieu aqueux. La limite observée pour GdLcis et GdLtrans est de 25µM. Au-delà de cette concentration, nous avons remarqué l'apparition d'une suspension dans la solution.

Tableau IV.1: Résultats des coefficients de partition octanol/eau des complexes GdLcis et GdLtrans.

Complexe	Concentrations (µM)	Log P
[GdLcis]	20	-0,285
[GdLcis]	8	0,264
[GdLtrans]	10	0,833

Les résultats du tableau IV.1 montrent une différence notable entre les deux complexes à des concentrations similaires. Le composé GdLtrans présente un caractère lipophile (log P=0,83) plus marqué que le GdLcis (log P=0,26) et légèrement supérieur au complexe GdL2 (log P=0,63) qui porte un seul bras ciblant. De plus, on constate que l'ajout d'un second bras ciblant n'augmente pas ou peu la lipophilie. En effet, le remplacement d'un carboxylate par une fonction amide provoque une augmentation de la charge, qui devient positive, au niveau du complexe métallique. Cette charge contrebalance ainsi le caractère hydrophobe du bras.

Dans les chapitres précédents, nous avons observé que, dans cette gamme de concentration micromolaire, de tels composés pouvaient adopter plusieurs formes agrégées en solution. C'est pourquoi nous avons mesuré le log P de GdLcis à deux concentrations. A une concentration plus élevée du complexe GdLcis, nous avons observé une diminution du log P qui devient même négatif. Nous pouvons supposer qu'à 20 µM, le complexe aurait tendance à adopter une forme agrégée où les unités ABT auraient moins d'interaction avec le milieu aqueux car elles sont plutôt « cachées » dans le cœur hydrophobe des agrégats micellaires.

Ces résultats marquent la complexité des systèmes que nous avons développés, ce qui laisse prévoir des difficultés dans la prédiction du comportement des complexes en présence des peptides.

4.2 Détermination de la Concentration Micellaire Critique (CMC)

La très faible solubilité des complexes *GdLtrans* et *GdLcis* rend impossible toutes les études de la CMC par relaxométrie. C'est pourquoi nous utiliserons uniquement les méthodes optiques, à savoir les spectroscopies UV-vis et de fluorescence.

4.2.1 Techniques de la détermination de la CMC : UV-vis

i. Cas de *GdLtrans* :

La variation ainsi que l'intensité de l'absorbance du complexe *GdLtrans* sont faibles par rapport aux systèmes étudiés dans le chapitre II (Figure IV.8A). Ceci s'explique par une forte diminution du coefficient d'extinction molaire en augmentant la concentration, $5800 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour $25 \mu\text{M}$ à $53000 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour $1 \mu\text{M}$, ceci est probablement causée par un phénomène π -stacking¹⁹. En effet, la structure des complexes dans la solution évolue vers un état micelles-agrégats et, dans le cas du *GdLtrans*, il est alors possible que les structures adoptées favorisent ce phénomène.

Néanmoins, la figure IV.8 met en évidence un effet bathochrome au niveau des spectres d'absorbance que nous avons mis en évidence sur le tracé λ_{max} en fonction de la concentration (Figure IV.8B). Nous observons ainsi, pour les concentrations inférieures à $5 \mu\text{M}$, un état de *GdLtrans* où le λ_{max} est constant. Puis, à partir de $5 \mu\text{M}$, on note que le déplacement bathochrome est de plus en plus marqué et matérialisé par deux droites dont l'intersection est à $15 \mu\text{M}$, dû au changement des propriétés optiques du complexe suivant sa structure en solution (micelles ou agrégats).

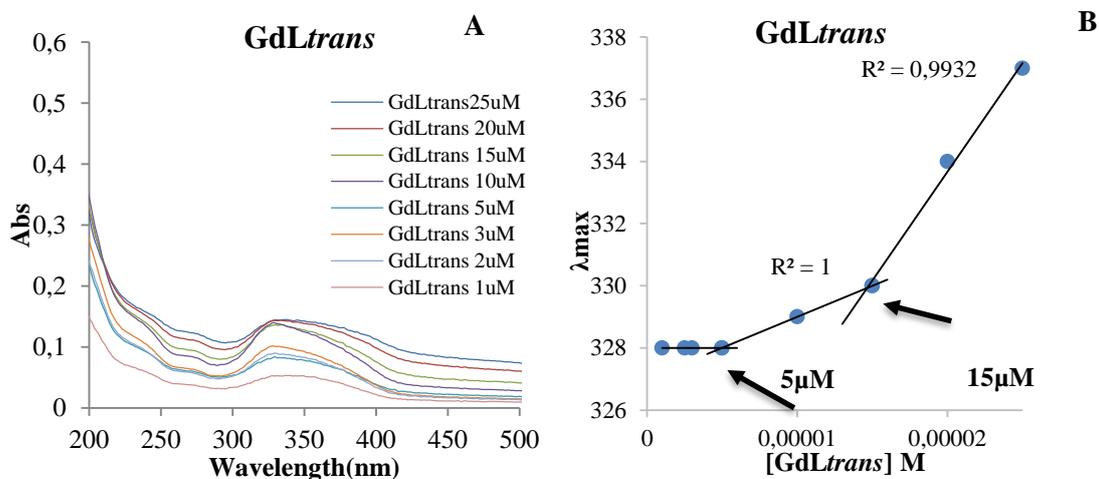


Figure IV.8: Spectre UV-vis du complexe *GdLtrans*(A), λ_{max} en fonction de la concentration (B) à, pH 7.4 dans l'eau à 25°C et une cuve de 1cm.

Cependant, les faibles valeurs d'absorbance obtenues ainsi que solubilité assez limitée du composé entraînent des erreurs importantes sur la mesure. La technique s'avère limitée pour l'étude de ce composé, nous utiliserons la fluorescence dans un deuxième temps pour remédier à ce problème.

ii. Cas de GdLcis

La figure IV.9.A montre les spectres d'absorption UV-vis du GdLcis en fonction de la concentration entre 5 et 25 μ M. Pour ces concentrations, nous obtenons des valeurs d'absorption comprises entre 0 et 0.7.

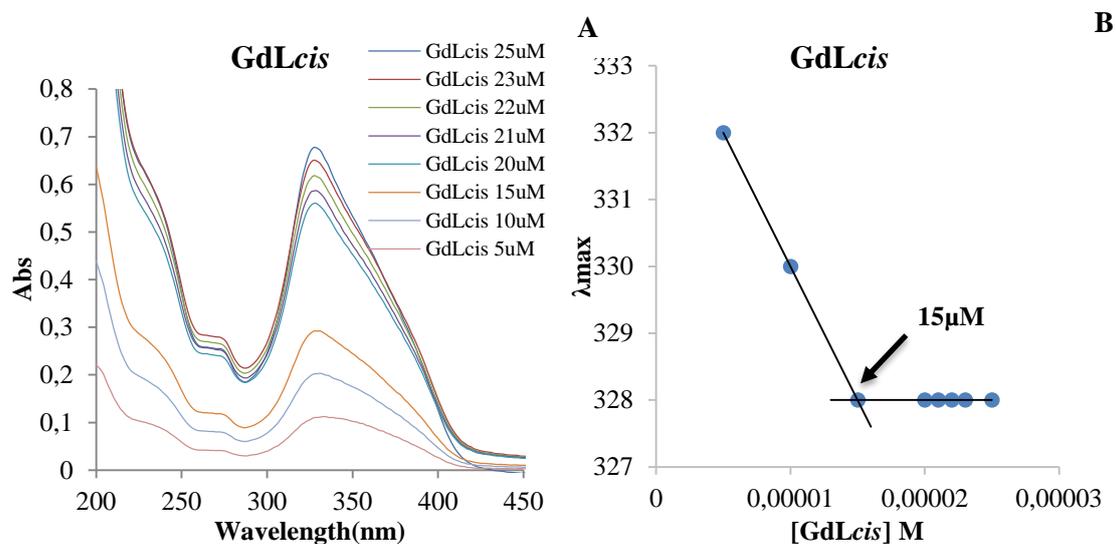


Figure IV.9: Spectres UV-vis du complexe GdLcis (A), et λ_{max} en fonction de la concentration (B), à pH 7.4 dans l'eau à 25°C, cuve de 1cm.

Le coefficient d'extinction molaire moyen déterminé est de $\epsilon=28300 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et est du même ordre de grandeur que celui de GdL2 ($\epsilon=30800 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Comme lors des études réalisées dans le chapitre II, on note un effet hypsochrome au niveau de la longueur d'onde du maximum d'absorption. Ceci marque un changement des propriétés optiques du complexe caractéristique d'un changement de structure de GdLcis en solution. En traçant λ_{max} en fonction de la concentration (Figure IV.9), nous pouvons déterminer un changement de pente abrupte à 15 μ M, une valeur que nous assimilons à la valeur de CMC de GdLcis dans l'eau.

4.2.2 Bilan

Dans la gamme de concentration de 1-25 μ M étudiée, nous avons observé, un effet bathochrome pour le GdLtrans et un effet hypsochrome pour le GdLcis. Ces effets observés caractérisent un changement au niveau des propriétés optiques des complexes. Ceci nous

rappelle l'effet hypsochrome obtenu avec les complexes ayant un seul bras de ciblage. Les CMCs obtenues sont 5 et 15 μ M pour GdL*trans* et 15 μ M pour GdL*cis*. On peut supposer que les suspensions observées dans les solutions aux concentrations respectivement supérieures à 25 μ M pour GdL*cis* et GdL*trans* sont liées à la faible solubilité.

Il est difficile de comparer les valeurs CMC obtenues dans cette étude avec celles obtenues pour les complexes GdL1-3 car la gamme de concentration est beaucoup plus restreinte. On ne peut pas statuer sur les effets que peuvent avoir les différentes modifications de structure, à savoir l'ajout d'un second bras ciblant hydrophobe et l'apparition d'une charge.

Comme nous l'avons signalé dans le chapitre II, avec les complexes GdL1-3, la limite de détection de la spectroscopie UV-vis avec nos systèmes est de l'ordre du micromolaire. Pour GdL*cis* et GdL*trans*, nous sommes donc à la limite de cette technique. Pour confirmer les résultats obtenus, nous allons utiliser la technique de fluorescence.

4.2.3 Fluorescence

Cette technique nous a permis d'étudier une gamme de concentration allant du millimolaire au nanomolaire avec les complexes GdL1-3 dans l'eau. Dans le cas des complexes GdL*cis* et GdL*trans*, au vu de leur faible solubilité, nous avons également décidé de réaliser cette étude dans l'eau, puisque la présence de tampon diminue encore plus la solubilité.

i. Cas de GdL*trans*

Les résultats avec GdL*trans* sont les suivants :

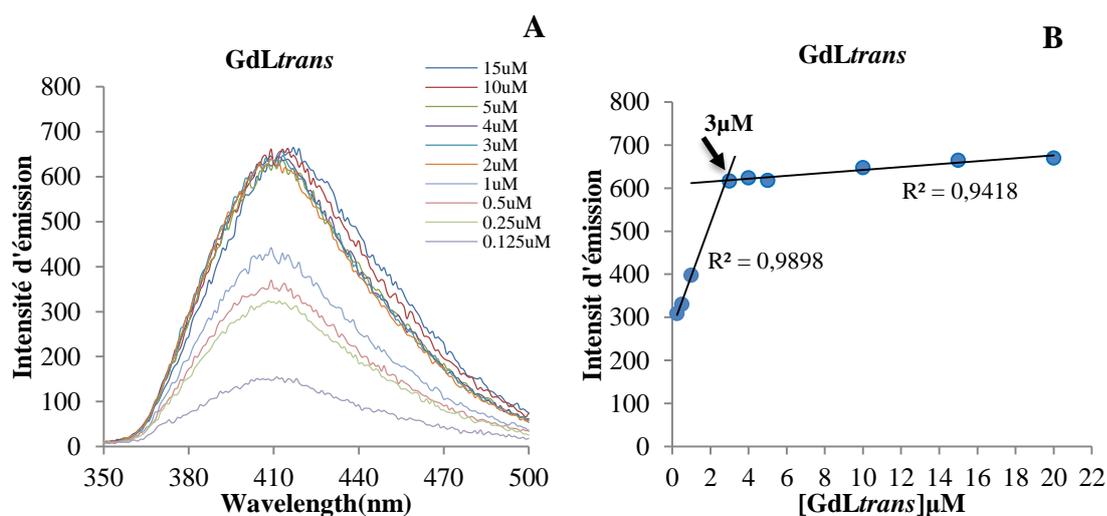


Figure IV.10: Spectres d'émission de GdL*trans* dans l'eau, λ_{ex} =330nm (A) et l'intensité d'émission en fonction de la concentration de GdL*trans*, λ_{em} =417nm (B), à 37°C, pH 7.4, cuve de 1cm.

Dans le cas du GdL*trans*, compte tenue de la gamme de concentration étudiée et du coefficient d'absorption molaire de ce complexe, la densité optique est faible ($A < 0,1$) au cours de cette étude. Nous pouvons ainsi prendre en compte les résultats obtenus. La variation de l'intensité d'émission en fonction de la concentration (Figure IV.10B) montre deux régimes caractérisés par deux droites dont l'intersection se situe à une concentration de $3\mu\text{M}$.

ii. Cas de GdL*cis*

Les résultats avec GdL*cis* sont les suivants :

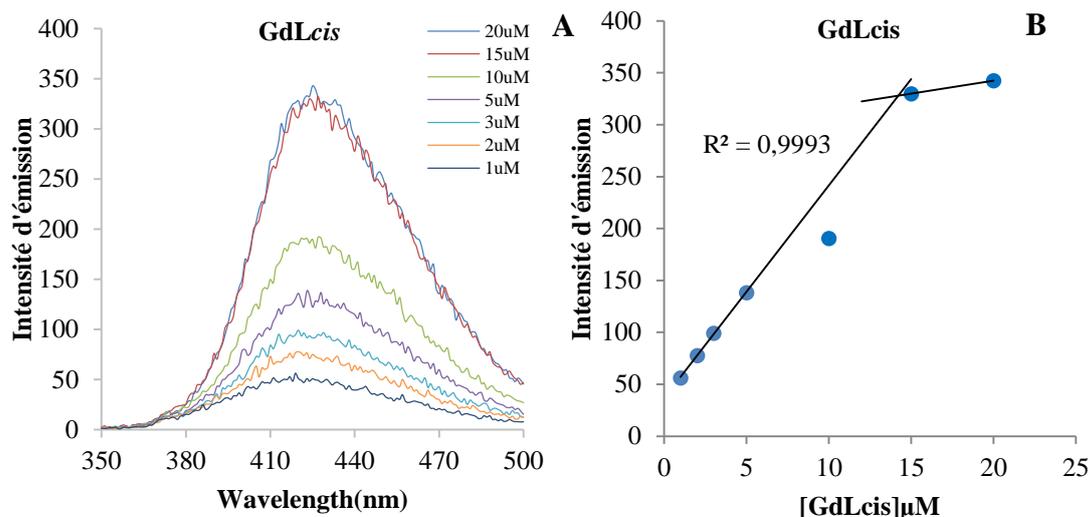


Figure IV.11: Spectre d'émission de GdL*cis* dans l'eau, $\lambda_{\text{ex}}=330\text{nm}$, (A) et l'intensité d'émission en fonction de la concentration de GdL*cis* $\lambda_{\text{em}}=417\text{nm}$, (B), à 37°C , pH 7.4, cuve de 1cm.

Une variation non-linéaire caractérisée par une rupture à $14,5\mu\text{M}$ dans la figure IV.11B est observée. Bien que cette valeur soit cohérente avec la mesure réalisée en spectroscopie UV-Vis et que nous n'observons pas de décroissance caractéristique de l'effet de filtre interne pour les concentrations les plus élevées, la densité optique se situe juste au dessus de la limite évoquée précédemment. De plus la rupture de pente n'est pas bien définie. Par conséquent, nous ne considérerons le résultat de cette étude par la suite.

4.2.4 Conclusion sur la partie détermination de la CMC

Lors de l'étude des complexes avec deux unités de ciblage, nous nous sommes confrontés au problème de solubilité du produit, ce qui a rendu impossible l'étude de ces complexes par relaxométrie.

Les résultats de fluorescence et de l'UV-Vis montrent des changements d'état à environ 5 μ M pour le complexe GdL*trans* et à environ 15 μ M pour le GdL*cis*.

Tableau IV.2: Tableau récapitulatif des valeurs de CMC de GdL*trans* et GdL*cis*.

	GdL<i>trans</i>	GdL<i>cis</i>	GdL2
UV-Vis	15 et 5 μ M	15 μ M	35 μ M
Fluorescence	3 μ M	-	

D'autre part, la variation d' ϵ , un facteur de 10 a été signalé au niveau des spectres UV-vis de GdL*trans*, ce qui mène à penser à un phénomène de π -stacking au niveau des dérivés de PiB dans les agrégats formés par des molécules, montrant une différence entre les processus de micellisation des deux complexes.

En se basant sur les valeurs de CMC et les coefficients de partage octanol/eau, à la limite des formes monomériques, le GdL*cis* à 8 μ M (0.264) aura un caractère plus hydrophile, donc moins lipophile que le GdL*trans* (0.833 pour 10 μ M).

4.3 Détermination de la taille de GdL*cis* et GdL*trans* par la technique de DLS

La détermination de la taille des particules permet une meilleure compréhension des phénomènes d'affinité aux peptides amyloïdes que nous allons déterminer par SPR. Dans ce cas de figure, nous avons réalisé les mesures des tailles des particules dans l'eau, à 37°C (Tableau IV.3), avec la technique de la diffusion dynamique de la lumière (chapitre II, paragraphe 3.3.2).

Tableau IV.3: Résultats des mesures de taille et de charge à différentes concentrations de complexes dans l'eau, à 37°C

Complexes	Concentrations (μM)	Tailles (nm)	PI	Zeta
GdL<i>cis</i>	18	2300	0.49	Neutre (Limite)
	10	1700	1.29	(-16mV, -14mV, -12mV)
	2	1.6	0.23	
GdL<i>trans</i>	15	2800	0.97	(-)
	10	2300	1.5	
	1	9.0	0.35	

La charge est déterminée à partir du potentiel mesuré pour une solution donnée. Les valeurs du potentiel entre 15 à -15mV stipulent une charge globale neutre avec une tendance négative. Au-delà de cet intervalle la molécule est dite chargée positivement si le potentiel est supérieur à 15mV et chargée négativement à des valeurs de potentiel inférieures à -15mV.

Les résultats obtenus pour la charge de ces particules sont surprenants. Ces complexes devaient avoir une charge globale positive. Mais ce que nous avons comme résultats est différent, les particules de *GdLcis* présentent une charge globale neutre et celles de *GdLtrans* présentent une charge globale négative. Ceci nous remonte à la définition du potentiel Zeta qui est le potentiel entre la couche fixe des contre ions (charge (-) dans le cas des *GdLtrans* et *GdLcis*) et la distance où l'électroneutralité est rétablie (Chapitre II, figure 14). Donc, la seule explication de cette constatation est que la distance est assez courte pour établir la neutralité vue que les tailles mentionnées dépassent les tailles de nanoparticules et des micelles ordinaires.

4.4 Etude de l'affinité de *GdLtrans* et de *GdLcis* aux peptides amyloïdes

Afin de pouvoir évaluer l'effet de l'ajout d'une seconde unité ciblant sur l'affinité des complexes aux peptides cibles, nous allons utiliser la technique SPR dans les mêmes conditions que précédemment (pH 7.4, 37°C et 9000RU d'immobilisation).

4.4.1 Cas du peptide A β ₁₋₄₀

Dans ces conditions, nous n'avons pas réussi à détecter une interaction entre les complexes *GdLtrans*, *GdLcis* et le peptide A β ₁₋₄₀ immobilisé.

Cela signifie que la constante de dissociation éventuelle devrait être largement supérieure à 20 μ M, marquant ainsi la faible affinité de ces complexes envers le peptide A β ₁₋₄₀.

4.4.2 Cas de l'amyline

i. Modèle de Langmuir

Nous avons détecté des interactions entre les complexes *GdLtrans* et *GdLcis* avec l'amyline et le modèle Langmuir 1:1 donne les fits ci-dessous (Figure IV.12) :

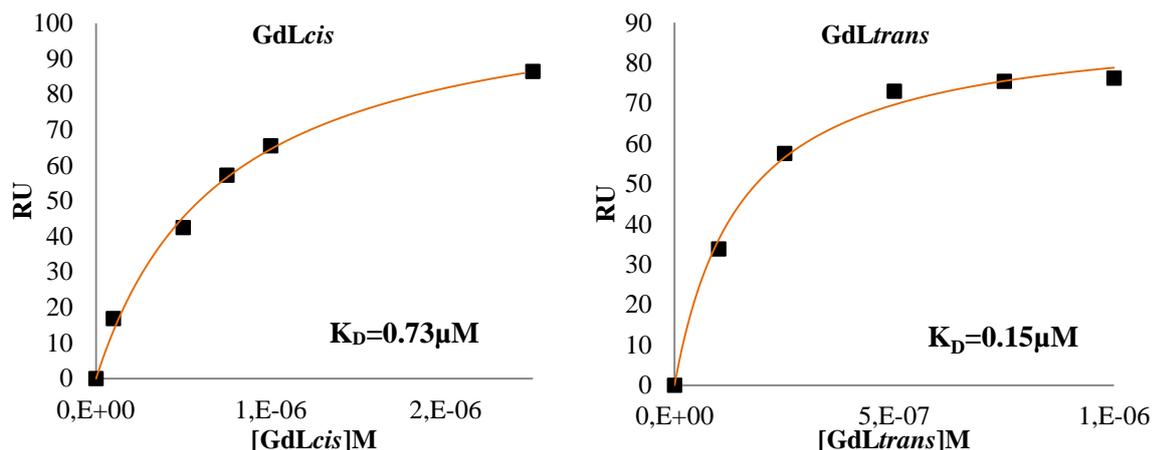


Figure IV.12: Représentation de Langmuir des résultats SPR obtenus pour l'interaction du GdLcis et GdLtrans avec l'amyline, pH 7.4, à 37°C.

Les constantes de dissociation obtenues sont respectivement $K_D = 0.73 \mu\text{M}$ et $K_D = 0.15 \mu\text{M}$ pour GdLcis et GdLtrans. Ces valeurs sont environ 20 et 100 fois moins élevées que le K_D de GdL2 ($17 \mu\text{M}$) et montrent l'apport positif de la modification de structure, notamment pour la position *trans*.

Dans le cas de nos complexes, nous savons que la partie complexante n'intervient pas dans l'interaction avec les peptides amyloïdes de type $A\beta_{1-40}$ et amyline. En effet, des études SPR avec un complexe de Gd(III) à base de DOTA conjugué à une chaîne de 12 carbones (Figure IV.14) sur les mêmes sensorchips (9000RU de peptides immobilisés) ont été réalisées et n'ont montré aucune interaction.

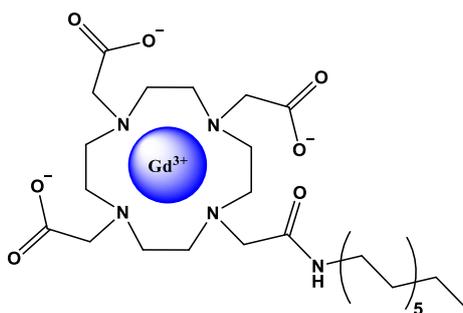


Figure IV.14: Le complexe de Gd(III) à base de DOTA avec un bras alkyle de 12 chainons.

Pour tenter d'expliquer la différence d'affinité mesurée entre les deux complexes, la pré-organisation *cis* ou *trans* semble être primordiale. En position *cis*, l'interaction des deux bras ciblant du complexe avec deux sites d'interaction, sur le peptide semble être plus difficile qu'en position *trans*.

De plus, même s'ils ont la même charge globale (+1) sous forme de monomère, il apparaît, suivant les mesures du potentiel zeta, que la charge des particules que forment les deux

complexes diffère. Ainsi le potentiel zeta du complexe *trans* montre une charge négative en solution qui serait plus favorable à l'interaction avec l'amyline, qui est chargée positivement.

Ces résultats suggèrent également que les deux complexes présentent une sélectivité à l'amyline par rapport à l'A β ₁₋₄₀ dans nos conditions de mesure, ce qui à notre connaissance (Tableau IV.4), n'a jamais été montré pour des sondes IRM à base de gadolinium, et qu'on retrouve pour l'amyvid et dans une moindre mesure pour AV-45 dans le cas des autres sondes d'imagerie.

Tableau IV.4: Constantes de dissociation et d'inhibition des molécules reportées pour les peptides amyloïdes et l'amyline.

Molécules	Peptides amyloïdes : A β		Amyline	
	K _i	K _D	K _i	K _D
Florbitapir (Amyvid)	K _i (A β ₁₋₄₀) =2.87±0.17nM ²⁰		K _i (Amyline) =3733±1225nM ²¹	
[¹²⁵I]IPBF	K _i (A β ₁₋₄₂) =2.36nM ²²		K _i (Amyline) =2.66 ±0.554nM	K _D (Amyline) =8.31±1.24 nM
FPYBF-1	K _i (A β ₁₋₄₂) =2.41±0.11nM ²³		K _i (Amyline) =12.5 ± 1.67nM	
ThT	K _i (A β ₁₋₄₀) =890nM ²⁴			K _D (Amyline) =791±91nM ²⁵
IMPY	K _i (A β ₁₋₄₀) =4.6±1.6nM ²⁶ K _i (A β ₁₋₄₂) =10.5±1.05nM	K _D (A β ₁₋₄₀) =4.2nM ²⁷	K _i (Amyline) =71.8 ± 10.1nM	
AV-45	K _i (A β) =4.02 ± 0.22nM ²⁸		K _i (Amyline) =501 ± 40.8nM	
PBF	K _i (A β ₁₋₄₂) = 2.36±0.53nM ²⁷		K _i (Amyline) =73.9 ± 5.68nM	
Danir-F 2c		K _D (A β ₁₋₄₂) =14.5nM ²⁹	K _i (Amyline) =29-160nM ²¹	K _D (Amyline) =80.5±6.2nM ²⁵

ii. La linéarisation du modèle de Langmuir (représentation de Scatchard)

Comme expliqué précédemment, le modèle Langmuir masque parfois certaines subtilités, car il permet de déterminer une constante de dissociation globale, mais ne permet pas toujours d'identifier si plusieurs types d'interaction existent entre les complexes et les peptides.

La linéarisation de Scatchard est présentée sur la figure IV.15.

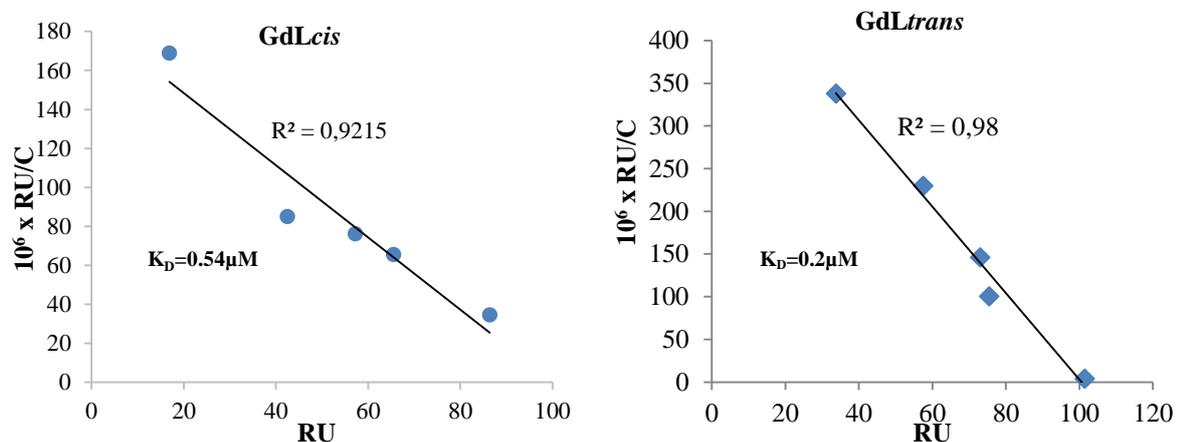


Figure IV.15: Représentation Scatchard de l'interaction des complexes GdLcis et GdLtrans avec l'amyline, pH 7.4, à 37°C.

Dans les deux cas présentés ici, la représentation de Scatchard est une droite dont la pente est $1/K_D$. Nous n'observons ainsi qu'un seul régime d'interaction entre ces complexes et l'amyline et, les constantes de dissociation déterminées par cette méthode sont similaires à celles déterminées précédemment et sont respectivement $K_D = 0,54\mu\text{M}$ et $K_D = 0,2\mu\text{M}$ pour GdLcis et GdLtrans (Tableau IV.5).

Contrairement aux complexes GdL1, GdL2 et GdL3, les complexes GdLcis et GdLtrans ne semblent exister que sous une seule forme dans cette gamme de concentration très restreinte, entre 0,125 et 3µM. Les mesures ont, en effet, été effectuées à des concentrations inférieures aux valeurs de CMC déterminées. Il est difficile de savoir si les complexes se trouvent sous une forme monomérique ou si cette dernière apparaît à des concentrations encore plus faibles. Le problème de solubilité ne nous a pas permis de déterminer avec précision les constantes de dissociation de nos complexes avec le peptide amyloïde Aβ₁₋₄₀. Dans ce cas, il est impossible d'évaluer l'apport d'un second bras ciblant.

Tableau IV.5: Les constantes de dissociation des complexes GdL*trans* et GdL*cis* relatifs à l'interaction avec l'amyline avec le modèle de Langmuir et la linéarisation de scatchard.

Complexes	K_D (Amyline) Langmuir	K_D (Amyline) Scatchard
GdL <i>trans</i>	0.15±0.02µM	0.2µM
GdL <i>cis</i>	0.73±0.09µM	0.54µM

4.4.3 Conclusion sur les affinités

Par contre, dans le cas des études avec l'amyline, l'affinité complexe/peptide s'est révélée meilleure que pour le complexe de référence GdL2 ($K_D=17.2\mu\text{M}$). En effet, les constantes de dissociation sont respectivement 20 et 100 fois plus faibles pour GdL*trans* ($K_D=0.15\mu\text{M}$) et GdL*cis* ($K_D=0.73\mu\text{M}$).

De plus, les résultats avec le modèle de linéarisation Scatchard ont montré que, dans la gamme de concentration étudiée, seul un régime d'interaction était présent, contrairement aux complexes GdL1-3.

En outre, ces complexes ont également montré une sélectivité à l'amyline par rapport à l'A β_{1-40} . En effet, dans les mêmes conditions de concentrations des complexes et d'immobilisation des peptides sur le sensorchip, seules les mesures avec l'amyline ont été possibles. Néanmoins, il est difficile de définir si les différences d'affinité avec les deux peptides cibles est le résultat direct de l'ajout d'une seconde unité PiB, ou bien le résultat du changement de la charge globale des complexes par rapport à GdL2, qui induirait des assemblages plus affins. Il est même probable que ces différences d'affinité soient dues à ces deux changements simultanés. Cela nécessiterait des études complémentaires comme, par exemple, le changement d'un bras ciblant par un bras acétamide sans unité de reconnaissance vis-à-vis des peptides. La charge ne serait pas modifiée par rapport au complexe GdL*cis* et GdL*trans* et l'apport de la seconde unité PiB apparaîtrait plus clairement.

4.5 Etude de l'agrégation des peptides en présence des GdL1-3 par spectroscopie de dichroïsme circulaire

Vu que les solutions de GdL*trans* et GdL*cis* sont limitées à 25µM de concentration, les concentrations des peptides dans les échantillons peptide:complexe ont été fixées à 15µM et les concentrations des complexes étudiés ont été de 1.5, 7.5 et 15µM, afin d'éviter une éventuelle précipitation des complexes lors des mesures. Les expériences ont été réalisées dans l'eau à pH 7.4 et à 37°C.

Il est important de rappeler que les courbes correspondantes à des valeurs de λ inférieures à 205nm ne seront pas interprétées puisqu'elles correspondent à une saturation du détecteur.

4.5.1 Suivi de l'agrégation du peptide $A\beta_{1-40}$ en présence des complexes

i. Cas du GdLcis

Nous avons étudié l'effet des différentes concentrations de GdLcis (1.5, 7.5 et 15 μ M) sur la vitesse d'agrégation du peptide $A\beta_{1-40}$. Les résultats sont présentés par la figure IV.16:

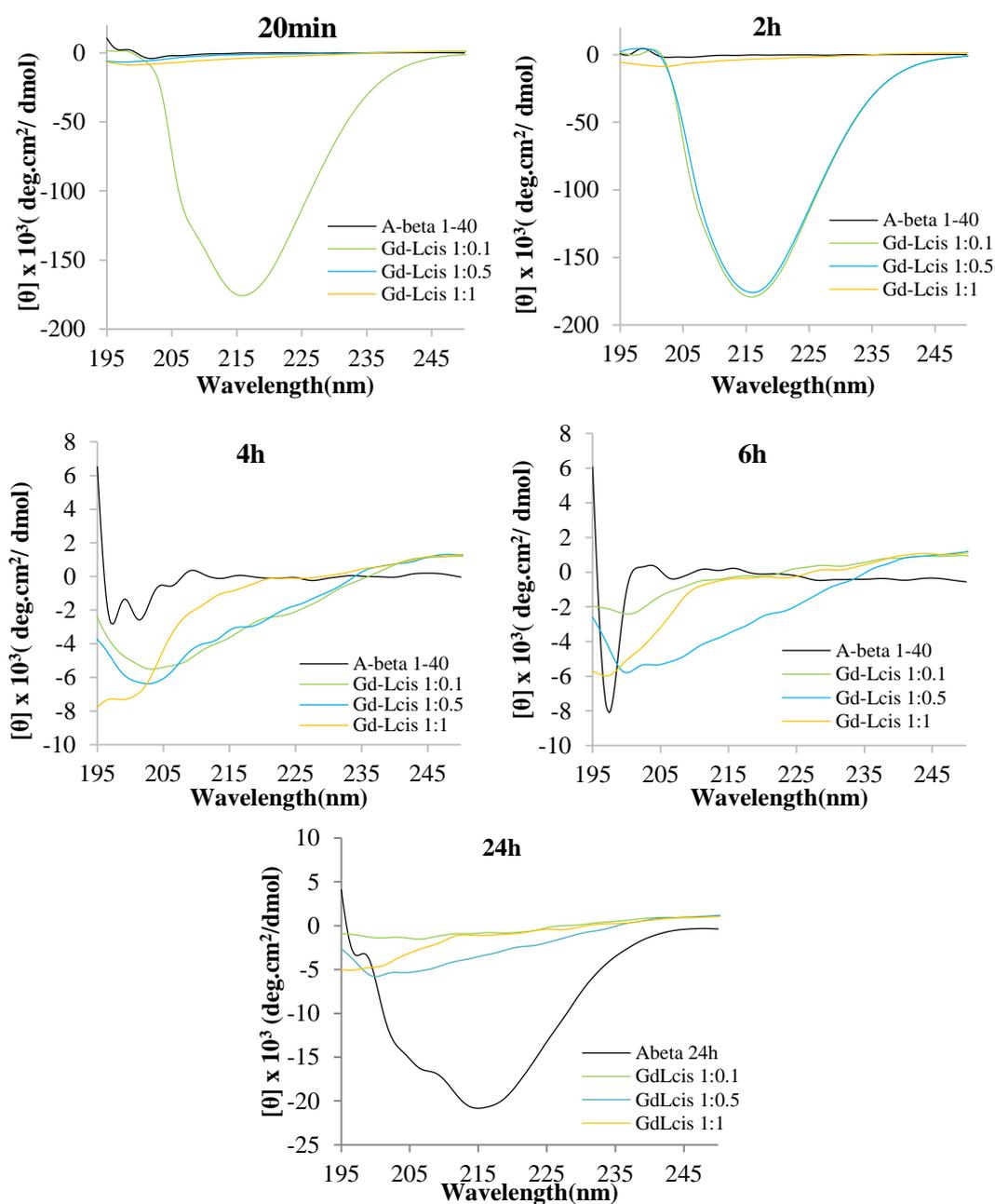


Figure IV.16: Spectre UV-CD de 15 μ M de l' $A\beta_{1-40}$ dans l'eau en présence de différents ratios de GdLcis (0.1, 0.5, 1) à différents temps (0h, 2h, 4h, 6h et 24h), à pH7.4, à 37°C.

En premier lieu, il est intéressant de noter que, parmi les concentrations de complexes étudiées, les deux premières se situent en dessous de la CMC mesurée ($12\mu\text{M}$).

Nous constatons qu'en présence de 1.5 et $7.5\ \mu\text{M}$ de complexe GdL*cis*, le processus d'agrégation du peptide semble s'accélérer fortement. Au bout de 20min, en présence de $1.5\ \mu\text{M}$ de complexe, le peptide présente un mélange de structure d'hélice α et de feuillets β pour finir avec une conformation majoritaire en feuillets β après 2h. A 4h, le signal est très faible voire inexistant car le peptide a précipité sous forme d'agrégats. En présence de $7.5\mu\text{M}$ de complexe, un seul spectre présentant majoritairement des conformations en feuillets β a été obtenu à 2h, ensuite, le peptide semble précipiter et aucun signal n'a été détecté. Il apparaît donc que les deux concentrations 1.5 et $7.5\mu\text{M}$ ont la même influence globale sur l'agrégation, à savoir une accélération, mais cette dernière est plus marquée lorsque la concentration de complexe est plus faible.

En ce qui concerne le ratio peptide complexe 1:1, la vitesse d'agrégation semble diminuer et devient plus lente que le peptide seul, puisque même à 24h, le signal est presque identique à celui obtenu au bout de 20min.

ii. Cas du GdL*trans*

Dans le cas de GdL*trans*, le même protocole expérimental a été adopté avec les mêmes concentrations. Cependant, lors des études sur la CMC, nous avons remarqué deux changements d'états à 5 et $15\ \mu\text{M}$. Ainsi, les 3 concentrations étudiées ici correspondent aux 3 états détectés. Les suivis de l'agrégation du peptide sont reportés sur la figure IV.17.

Premièrement, on remarque que les suivis du peptide $A\beta_{1-40}$ en présence de 1.5 et $15\mu\text{M}$ de complexe sont similaires. Le peptide présente une conformation en random coil pour la mesure à 20min. Ensuite, aux temps 2h et 4h, un mélange de conformation en hélice α et en feuillets β est observé. L'apparition d'une conformation majoritaire en β au bout de 6h est accompagnée d'une augmentation de l'intensité du signal du mélange 1:1. Ainsi, contrairement au cas du GdL*cis*, nous n'observons pas de précipitation du peptide $A\beta_{1-40}$ à 24h comme il a été montré dans le chapitre III, le peptide adopte rapidement une structure qui demeure stable au cours du temps et qui semble être majoritairement des feuillets β .

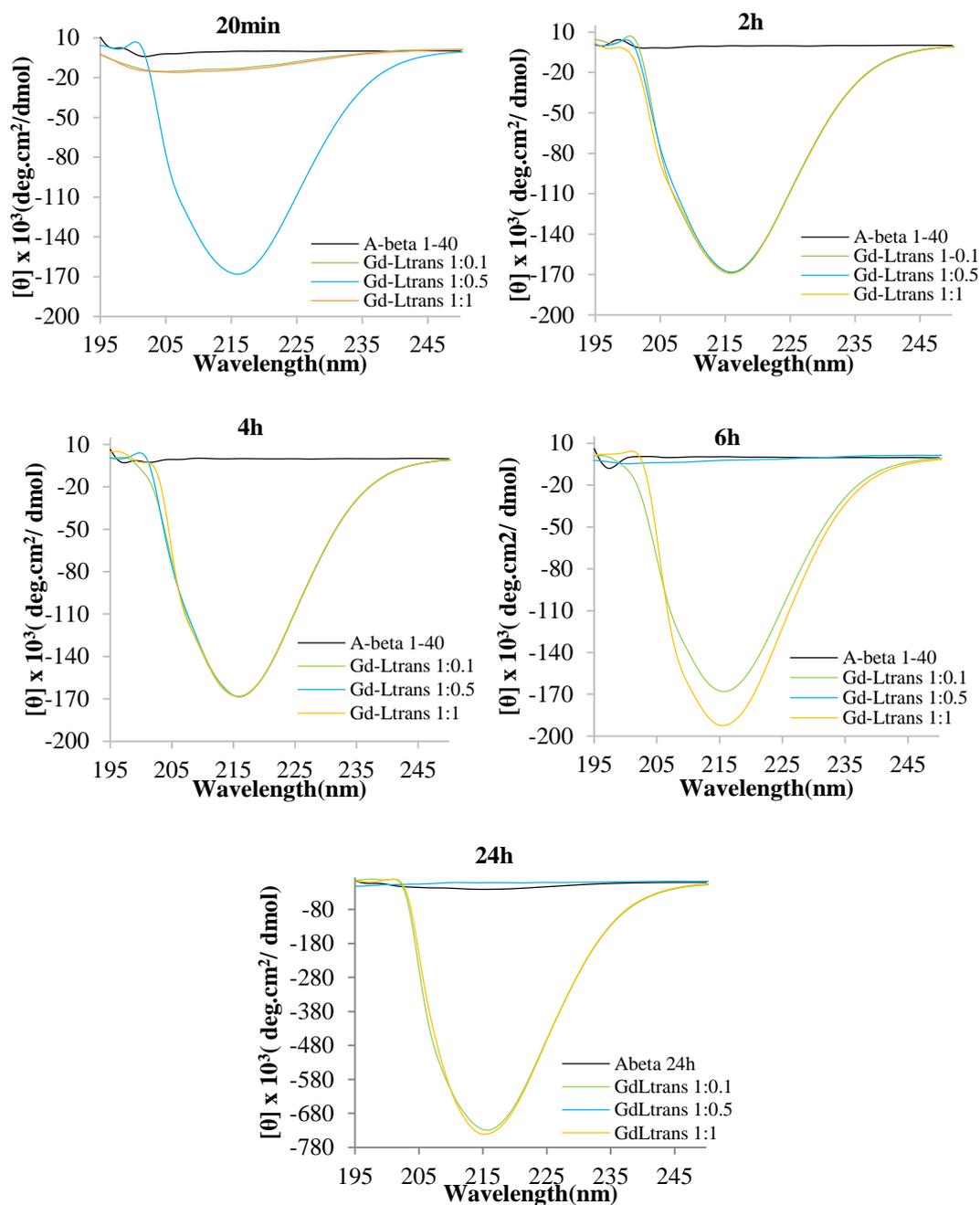


Figure IV.17: Spectre UV-CD de 15µM de l'Aβ₁₋₄₀ dans l'eau en présence de différents ratios de GdLtrans (0.1, 0.5, 1.1) à différents temps (0h, 2h, 4h, 6h et 24h), à pH7.4, à 37°C.

Dans le cas du ratio peptide:complexe 1:0.5, le comportement du peptide est différent et se rapproche de celui observé dans le cas du GdLcis. On a une agrégation qui est beaucoup plus rapide que le peptide seul, où les conformations observées sont majoritairement en feuillets β dès la première mesure jusqu'à 4h. Puis au temps 6h, le peptide précipite.

4.5.2 Bilan : Agrégation de l'A β ₁₋₄₀

Globalement, les complexes GdL*cis* et GdL*trans* ont tendance à accélérer l'agrégation du peptide puisque ce dernier adopte une conformation en feuillets β plus rapidement que dans le cas sans complexe.

Ensuite, en analysant plus précisément les données, on remarque des disparités suivant les concentrations des complexes :

- Lorsque GdL*cis* est à faible concentration, l'agrégation du peptide est encore plus rapide.
- La concentration de 7.5 μ M de GdL*trans* entraîne une agrégation rapide.
- Les concentrations de 1.5 et 15 μ M de GdL*trans* entraînent rapidement une conformation du peptide en feuillets β , qui semble stable au cours du temps.

Ces résultats confirment l'observation faite dans le chapitre III, certaines formes agrégées que les complexes adoptent ont plus d'influence sur l'agrégation des peptides étudiés.

Des études complémentaires sur un temps de suivi plus long devront être réalisées, notamment pour confirmer la stabilité des structures toujours présentes en solution à 24h.

4.5.3 Suivi de l'agrégation du peptide amyline en présence des complexes

i. Cas de GdL*cis*

En ce qui concerne l'amyline en présence de différentes concentrations de GdL*cis* (1.5, 7.5, 15 μ M), nous avons eu les résultats suivants :

Dans le suivi du peptide en présence de 1.5 μ M de complexe, nous n'avons pas observé de signal caractéristique d'une quelconque conformation du peptide. Cette expérience demande à être répétée, ce que nous n'avons pu faire par manque de temps.

Pour les deux autres concentrations de complexe étudiées, qui se situent de part et d'autres de la CMC mesurée, l'agrégation du peptide amyline est très différente. La présence de GdL*cis* à 15 μ M augmente la vitesse d'agrégation du peptide puisque l'on observe un signal qui correspond à un mélange de conformation hélices α et feuillet β au bout de 2h puis une précipitation au bout de 4h, alors que l'amyline seul adopte cette conformation hélices α -feuillet β à partir du temps 4h.

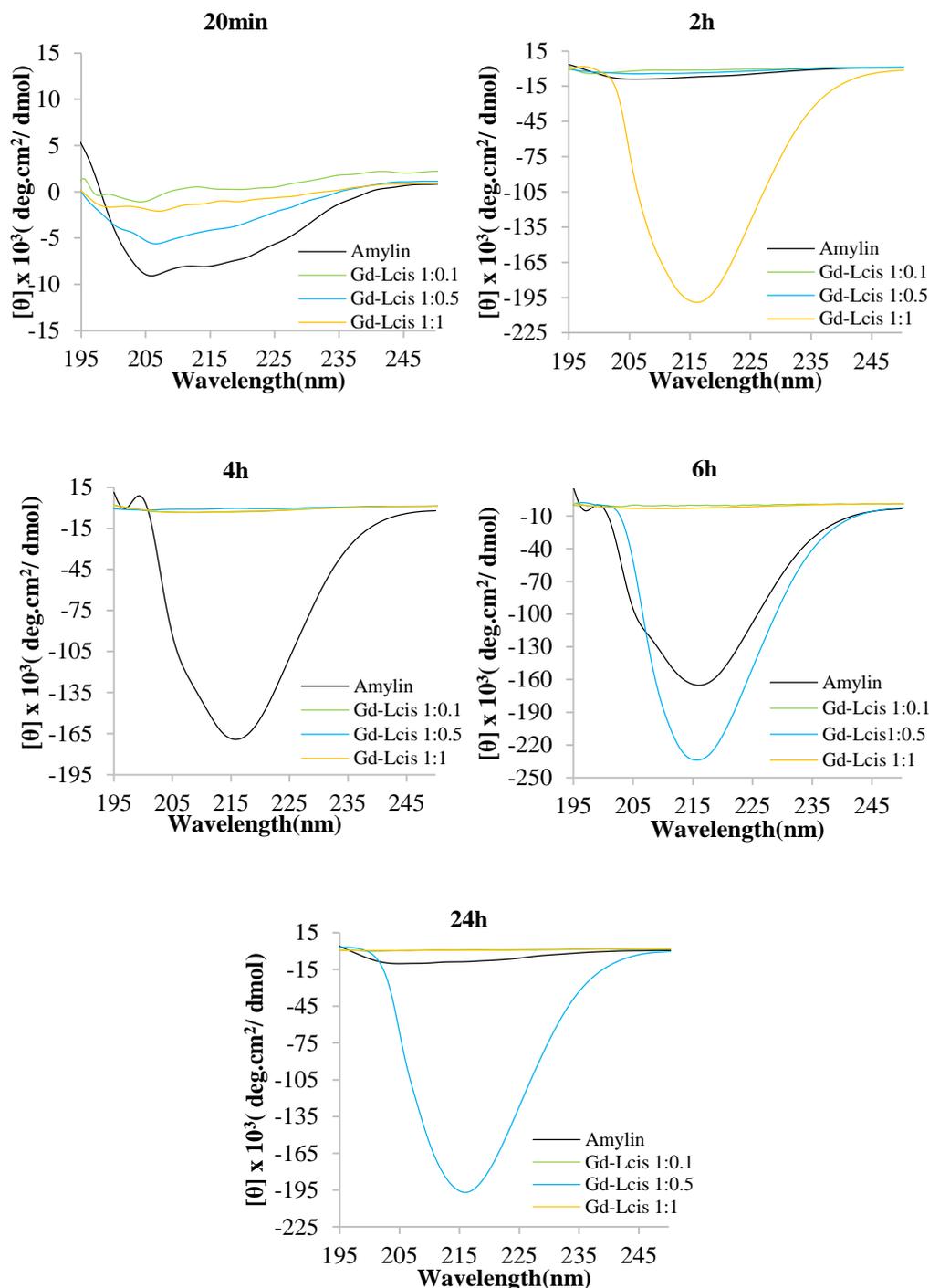


Figure IV.18: Spectre UV-CD de 15 μ M de l'Amyline dans l'eau en présence de différents ratios de GdLcis (0.1, 0.5, 1.1) à différents temps (0h, 2h, 4h, 6h et 24h), à pH7.4, à 37°C.

En ce qui concerne le ratio peptide:complexe 1:0.5, nous observons une conformation majoritaire en feuillet β seulement à partir de 6h qui reste stable au cours du temps puisqu'on retrouve cette conformation à 24h. Si l'on compare cette expérience à celle du peptide seul, on remarque que l'agrégation de l'amyline est ralentie, et qu'au lieu de précipiter sous forme d'agrégats, le peptide est maintenu en solution sous ce qui s'apparente à des feuillets β .

ii. Cas du GdLtrans

Les résultats d'agrégation de l'amyline en présence de différentes concentrations de GdLtrans (1.5, 7.5, 15µM) sont les suivants :

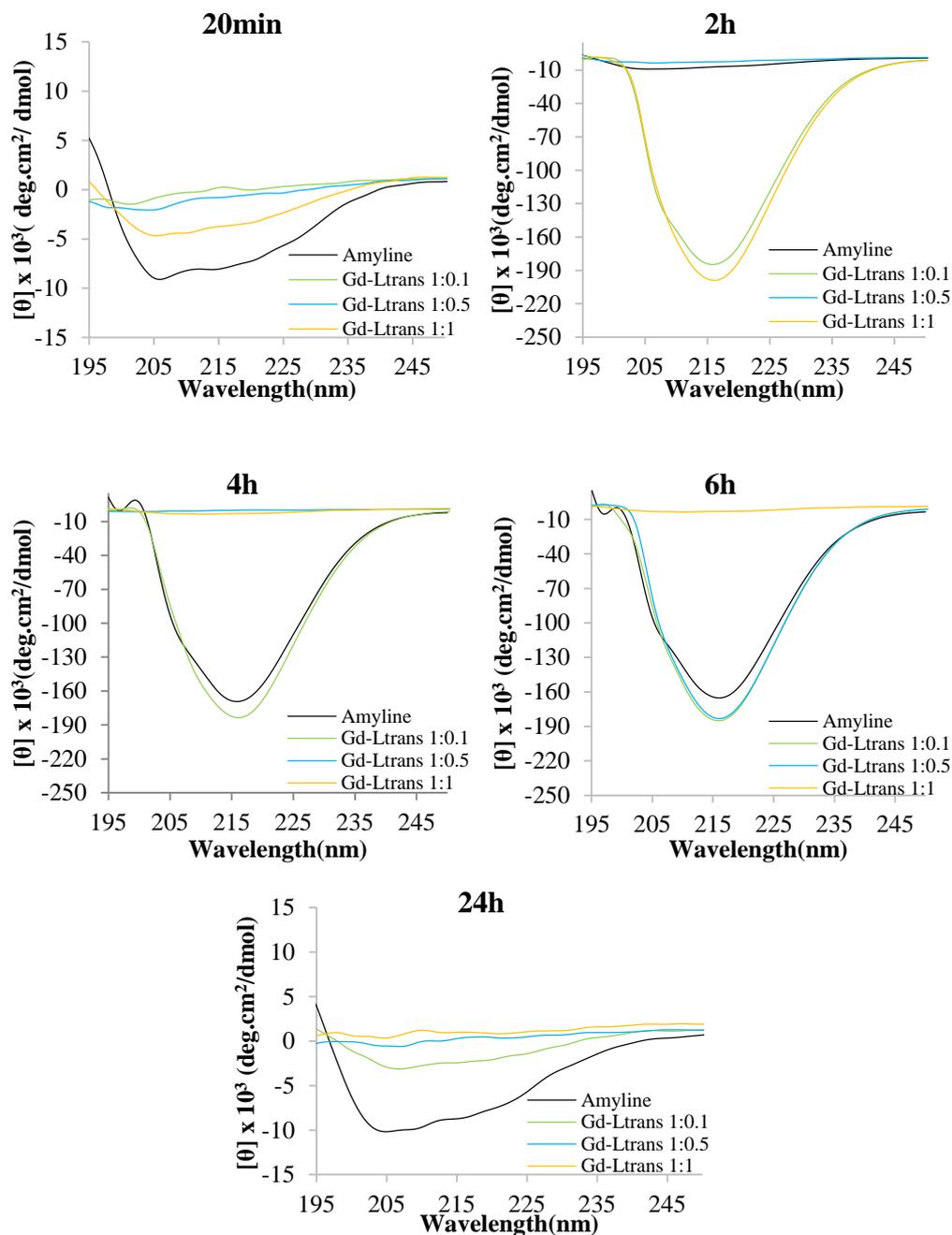


Figure IV.19: Spectre UV-CD de 15µM de l’Amyline dans l’eau à pH7.4, à 37°C en présence de différents ratios de GdLtrans (0.1, 0.5, 1.1) à différents temps (0h, 2h, 4h, 6h et 24h), à pH7.4, à 37°C.

Comme pour l’étude avec le peptide Aβ₁₋₄₀, les concentrations de GdLtrans de 1.5 et 15µM (ratio 1:0,1 et 1:1) ont la même tendance: le processus d’agrégation de l’amyline est amplifié. Au temps 2h, on note qu’en présence de ces concentrations de complexes, le peptide se trouve

sous un mélange hélices α et feuillet β alors que le peptide seul est toujours en random coil. Cependant on note une différence entre ces deux expériences. Au temps 4h, seul le peptide dans le ratio 1:1 a précipité tandis, dans le ratio 1:0.1, le signal du mélange conformationnel est conservé jusqu'au temps 6h.

Concernant l'expérience réalisée à un ratio de 1:0.5, un signal caractéristique du mélange hélices α et feuillets β n'est observé qu'au bout de 6h, ce qui est plus lent que pour l'amyline seul. Cependant, contrairement au précédent cas, cette structure du peptide n'est pas maintenue en solution puisque qu'à 24h, tout a précipité.

4.5.4 Bilan : Agrégation de l'amyline

Comme dans les études précédentes, ces expériences nous montrent que l'influence des complexes GdLcis et GdLtrans sur l'agrégation de l'amyline dépend surtout de la concentration des complexes et des différentes structures qu'ils peuvent adopter en solution.

Le premier enseignement de cette étude est, qu'à 15 μM , les deux complexes accélèrent l'agrégation du peptide. L'observation est la même à la plus faible concentration (1.5 μM) pour le GdLtrans.

Les résultats les plus notables sont obtenus pour la concentration intermédiaire de 7.5 μM :

- Le GdLcis ralentit l'agrégation de l'amyline et stabilise le peptide en solution.
- Le GdLtrans ralentit également l'agrégation de l'amyline même si le peptide précipite entre 6h et 24h.

Là aussi, il conviendrait de confirmer, sur un temps plus long, la stabilité du peptide dans le cas GdLcis à 7.5 μM et de déterminer plus précisément à quel temps l'amyline précipite en présence de GdLtrans.

5. Conclusion

Deux nouveaux complexes de gadolinium portant deux unités ciblantes, dérivés de PiB, ont été développées et caractérisés. Le but de ces nouveaux composés est d'optimiser la détection des plaques amyloïdes en améliorant leur affinité à ces peptides par rapport aux complexes GdL1-3 du chapitre précédent.

Les modifications au niveau de la structure des ligands ont grandement influencé leurs propriétés. En effet, le remplacement d'un bras acétate par un bras acétamide suivi d'une chaîne aliphatique et d'un dérivé PiB a entraîné une augmentation de la charge globale des

complexes (de 0 à +1), mais a surtout provoqué une chute importante de leur solubilité. A titre de comparaison, GdL2 possède une solubilité supérieure à 10mM alors que celles GdL*cis* et *trans* ne dépassent pas 25µM. Cette diminution a causé des difficultés dans la préparation et l'analyse des échantillons et a empêché l'utilisation de certaines techniques comme la relaxométrie.

Nous avons caractérisé ces complexes en déterminant leur coefficient de partition octanol/eau. Cependant, les complexes GdL*cis* et GdL*trans* ne présentent pas une augmentation de la lipophilie par rapport à GdL2 malgré l'ajout d'un bras hydrophobe. Le log P dépend de la structure adoptée par les complexes et on dénote des différences singulières, à concentration équivalente, entre GdL*cis* et GdL*trans*. De plus à différentes concentrations, le même complexe présente un log P différent, suivant sa structure plus ou moins complexe en solution.

La variation de log P en fonction de la concentration peut avoir une influence sur la biodistribution de ces composés ; les agents d'imagerie pourraient rencontrer leur cible plus difficilement.

L'étude de la micéllisation des complexes GdL*cis* et GdL*trans* a été réalisée par spectroscopie UV-vis et par fluorescence dans une gamme plus restreinte que pour GdL1-3. Là aussi, un changement de structure pour GdL*cis* et deux changements pour GdL*trans* ont été détectés dans la gamme de quelques micromolaires. Ceci prouve encore la complexité de ces systèmes dont les propriétés peuvent changer plusieurs fois dans un intervalle de 10µM.

L'affinité entre l'amyline et les complexes a été étudiée avec la technique SPR et a donné des résultats très intéressants. L'affinité est de même ordre de grandeur pour GdL*trans* et GdL*cis* (0.15µM et 0.73µM respectivement) exprimant un gain significatif par rapport aux résultats obtenus avec le complexe GdL2 (17.2µM).

Cependant, contrairement aux complexes GdL1-3 qui présentaient les mêmes affinités envers les peptides, amyline et Aβ₁₋₄₀, les complexes GdL*trans* et GdL*cis* possèdent des constantes de dissociation beaucoup plus faible pour l'amyline que pour l'Aβ₁₋₄₀. Cette discrimination de ces peptides amyloïdes est particulièrement intéressante et à ce jour, nouvelle pour des sondes d'imagerie. L'origine de cette sélectivité n'est pas claire car elle découle d'un changement de plusieurs paramètres, à savoir l'ajout d'un second bras hydrophobe ciblant et d'une augmentation de la charge des complexes. Ces modifications ajoutées à la différence de

Chapitre IV : Complexes avec deux bras de ciblage

structure *cis-trans* font que les complexes adoptent plusieurs formes de micelles-agrégats avec des propriétés intrinsèques différentes.

L'étude d'agrégation des peptides en présence des complexes ont révélé une tendance où globalement, l'agrégation des peptides est accélérée. Cependant, dans certaines conditions particulières, l'agrégation de l'amyline est ralentie voire bloquée. Ceci montre encore le caractère non monotone de type d'interaction et que l'influence des complexes sur les peptides est dépendante de leur concentration.

Pour conclure, les modifications de structure chimique réalisées dans ce chapitre ont permis d'apporter le gain en affinité envisagé. Des études complémentaires devront être réalisées pour comprendre la sélectivité observée de nos complexes envers les deux peptides et, l'importance de la charge dans ce phénomène.

Comme le GdL3 présente des propriétés plus intéressantes que le GdL2, tant au niveau de l'affinité que de son interaction avec l'amyline, il serait intéressant de réaliser et d'étudier ses analogues *cis* et *trans*. Cependant, il est fort probable que le problème au niveau de la solubilité subsiste ou soit amplifié.

6. Bibliographie

- (1) Qin, L.; Vastl, J.; Gao, J. Highly Sensitive Amyloid Detection Enabled by Thioflavin T Dimers. *Mol. BioSyst.* **2010**, *6* (10), 1791. <https://doi.org/10.1039/c005255h>.
- (2) LeVine, H. [18] Quantification of β -Sheet Amyloid Fibril Structures with Thioflavin T. In *Methods in Enzymology; Amyloid, Prions, and Other Protein Aggregates*; Academic Press, 1999; Vol. 309, pp 274–284. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)09020-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)09020-5).
- (3) Leuma Yona, R.; Mazères, S.; Faller, P.; Gras, E. Thioflavin Derivatives as Markers for Amyloid- β Fibrils: Insights into Structural Features Important for High-Affinity Binding. *ChemMedChem* **2008**, *3* (1), 63–66. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200700188>.
- (4) May, B. C. H.; Fafarman, A. T.; Hong, S. B.; Rogers, M.; Deady, L. W.; Prusiner, S. B.; Cohen, F. E. Potent Inhibition of Scrapie Prion Replication in Cultured Cells by Bis-Acridines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100* (6), 3416–3421. <https://doi.org/10.1073/pnas.2627988100>.
- (5) Bort, G.; Catoen, S.; Borderies, H.; Keksi, A.; Ballet, S.; Louin, G.; Port, M.; Ferroud, C. Gadolinium-Based Contrast Agents Targeted to Amyloid Aggregates for the Early Diagnosis of Alzheimer's Disease by MRI. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *87*, 843–861. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.016>.
- (6) Weisman, G. R.; Ho, S. C. H.; Johnson, V. Tetracyclic Tetraamines by Glyoxal-Macrocyclic Tetraamine Condensation. *Tetrahedron Letters* **1980**, *21* (4), 335–338. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)85466-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)85466-6).
- (7) Busch, D. H. The Complete Coordination Chemistry - One Practitioner's Perspective. *Chem. Rev.* **1993**, *93* (3), 847–860. <https://doi.org/10.1021/cr00019a001>.
- (8) Filali, A.; Yaouanc, J.-J.; Handel, H. Stoichiometric Mono N-Functionalization of Tetraazamacrocycles via Phosphoryl-Protected Intermediates. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1991**, *30* (5), 560–561. <https://doi.org/10.1002/anie.199105601>.
- (9) Bellouard, F.; Chuburu, F.; Kervarec, N.; Toupet, L.; Triki, S.; Mest, Y. L.; Handel, H. Cis-Diprotected Cyclams and Cyclens: A New Route to Symmetrically or Asymmetrically 1,4-Disubstituted Tetraazamacrocycles and to Asymmetrically Tetrasubstituted Derivatives. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, No. 23, 3499–3505. <https://doi.org/10.1039/A905701C>.
- (10) Synthetic strategies for preparation of cyclen-based MRI contrast agents | Elsevier Enhanced Reader <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0040403914021534?token=4A6B0333BECFBF1B7861024BB0722A4C07346FE0A8DED4D20D138CD59B144F6536606D73A6A0B66CCC7F4986C332A2BC> (accessed Jan 23, 2020). <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.12.087>.
- (11) Li, C.; Wong, W.-T. A Simple, Regioselective Synthesis of 1,4-Bis(Tert-Butoxycarbonylmethyl)-Tetraazacyclododecane. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (7), 2956–2959. <https://doi.org/10.1021/jo026436+>.
- (12) Kovacs, Z.; Sherry, A. D. A General Synthesis of 1,7-Disubstituted 1,4,7,10-Tetraazacyclododecanes. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, No. 2, 185. <https://doi.org/10.1039/c39950000185>.
- (13) De León-Rodríguez, L. M.; Kovacs, Z.; Esqueda-Oliva, A. C.; Miranda-Olvera, A. D. Highly Regioselective N-Trans Symmetrical Diprotection of Cyclen. *Tetrahedron Letters* **2006**, *47* (39), 6937–6940. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.07.135>.
- (14) Kotek, J.; Hermann, P.; Vojtíšek, P.; Rohovec, J.; Lukeš, I. 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. Czech. Chem. Commun.* **2000**, *65* (2), 243–266. <https://doi.org/10.1135/cccc20000243>.
- (15) Chuburu, F.; Tripier, R.; Baccon, M. L.; Handel, H. Bis-Aminals of Linear Tetraamines: Kinetic and Thermodynamic Aspects of the Condensation Reaction. *European Journal of Organic Chemistry* **2003**, *2003* (6), 1050–1055. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200390147>.

- (16) Rodríguez-Rodríguez, A.; Regueiro-Figueroa, M.; Esteban-Gómez, D.; Rodríguez-Blas, T.; Patinec, V.; Tripier, R.; Tircsó, G.; Carniato, F.; Botta, M.; Platas-Iglesias, C. Definition of the Labile Capping Bond Effect in Lanthanide Complexes. *Chemistry – A European Journal* **2017**, *23* (5), 1110–1117. <https://doi.org/10.1002/chem.201604390>.
- (17) Oukhatar, F.; Beyler, M.; Tripier, R. Straightforward and Mild Deprotection Methods of N-Mono- and N,N-Functionalised Bisaminal Cyclens. *Tetrahedron* **2015**, *71* (23), 3857–3862. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2015.04.021>.
- (18) Morfin, J.-F.; Tripier, R.; Baccon, M. L.; Handel, H. Bismuth (III) Coordination to Cyclen and Cyclam Bearing Four Appended Groups. *Polyhedron* **2009**, *28* (17), 3691–3698. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2009.08.003>.
- (19) Kumar, N. S. S.; Gujrati, M. D.; Wilson, J. N. Evidence of Preferential π -Stacking: A Study of Intermolecular and Intramolecular Charge Transfer Complexes. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (30), 5464. <https://doi.org/10.1039/c0cc00249f>.
- (20) Choi, S. R.; Golding, G.; Zhuang, Z.; Zhang, W.; Lim, N.; Hefti, F.; Benedum, T. E.; Kilbourn, M. R.; Skovronsky, D.; Kung, H. F. Preclinical Properties of 18F-AV-45: A PET Agent for A β Plaques in the Brain. *J Nucl Med* **2009**, *50* (11), 1887–1894. <https://doi.org/10.2967/jnumed.109.065284>.
- (21) Watanabe, H.; Kawano, K.; Shimizu, Y.; Iikuni, S.; Nakamoto, Y.; Togashi, K.; Ono, M. Development of Novel PET Imaging Probes for Detection of Amylin Aggregates in the Pancreas. *Mol. Pharmaceutics* **2020**, *17* (4), 1293–1299. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b01309>.
- (22) Yoshimura, M.; Ono, M.; Watanabe, H.; Kimura, H.; Saji, H. Feasibility of Amylin Imaging in Pancreatic Islets with β -Amyloid Imaging Probes. *Scientific Reports* **2015**, *4* (1). <https://doi.org/10.1038/srep06155>.
- (23) Ono, M.; Cheng, Y.; Kimura, H.; Cui, M.; Kagawa, S.; Nishii, R.; Saji, H. Novel ¹⁸F-Labeled Benzofuran Derivatives with Improved Properties for Positron Emission Tomography (PET) Imaging of β -Amyloid Plaques in Alzheimer's Brains. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (8), 2971–2979. <https://doi.org/10.1021/jm200057u>.
- (24) Coyne, C. P. *Comparative Diagnostic Pharmacology: Clinical and Research Applications in Living-System Models*; John Wiley & Sons, 2008.
- (25) Watanabe, H.; Miki, Y.; Shimizu, Y.; Saji, H.; Ono, M. Synthesis and Evaluation of Novel Two-Photon Fluorescence Probes for in Vivo Imaging of Amylin Aggregates in the Pancreas. *Dyes and Pigments* **2019**, *170*, 107615. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107615>.
- (26) Song, J.; Peng, X.; Li, L.; Yang, F.; Zhang, X.; Zhang, J.; Dai, J.; Cui, M. Al18F-NODA Benzothiazole Derivatives as Imaging Agents for Cerebrovascular Amyloid in Cerebral Amyloid Angiopathy. *ACS Omega* **2018**, *3* (10), 13089–13096. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01120>.
- (27) Ono, M.; Cheng, Y.; Kimura, H.; Watanabe, H.; Matsumura, K.; Yoshimura, M.; Iikuni, S.; Okamoto, Y.; Ihara, M.; Takahashi, R.; Saji, H. Development of Novel ¹²³I-Labeled Pyridyl Benzofuran Derivatives for SPECT Imaging of β -Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease. *PLoS ONE* **2013**, *8* (9), e74104. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074104>.
- (28) Zha, Z.; Ploessl, K.; Choi, S. R.; Alexoff, D.; Kung, H. F. Preclinical Evaluation of [18F]D3FSP, Deuterated AV-45, for Imaging of β -Amyloid in the Brain. *Nuclear Medicine and Biology* **2020**. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2020.03.003>.
- (29) Fu, H.; Tu, P.; Zhao, L.; Dai, J.; Liu, B.; Cui, M. Amyloid- β Deposits Target Efficient Near-Infrared Fluorescent Probes: Synthesis, in Vitro Evaluation, and in Vivo Imaging. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (3), 1944–1950. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04441>.
- (30) Riesen, A.; Zehnder, M.; Kaden, T. A. Metal Complexes of Macrocyclic Ligands. Part XXIII. Synthesis, Properties, and Structures of Mononuclear Complexes with 12- and 14-Membered Tetraazamacrocycle-N,N',N'',N'''-Tetraacetic Acids. *Helvetica Chimica Acta* **1986**, *69* (8), 2067–2073. <https://doi.org/10.1002/hlca.19860690830>.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les travaux présentés dans cette thèse focalisent sur la synthèse et la caractérisation physicochimique de nouveaux complexes de Gd(III) capables d'interagir avec des peptides amyloïdes A β et amyline. De tels complexes peuvent servir comme agents d'imagerie pour la détection des plaques amyloïdes, notamment de l'amyline dans le cas du diabète de type II. En effet, l'accumulation des dépôts d'amyline dans le pancréas est caractéristique de cette maladie. Alors que le passage de ces complexes dans le cerveau pour une détection de l'A β lié à la maladie d'Alzheimer reste très problématique, le pancréas est plus accessible à la délivrance des agents d'imagerie.

Notre objectif a été de développer des complexes thermodynamiquement stables et cinétiquement inertes qui portent une ou deux unités de reconnaissance pour les peptides amyloïdes (Figure 1). Ces complexes permettront de créer une plateforme moléculaire pour une détection par IRM (complexes de Gd(III)), mais les mêmes ligands peuvent être complexés à d'autres métaux comme l' $^{111}\text{In(III)}$ pour une application en imagerie nucléaire.

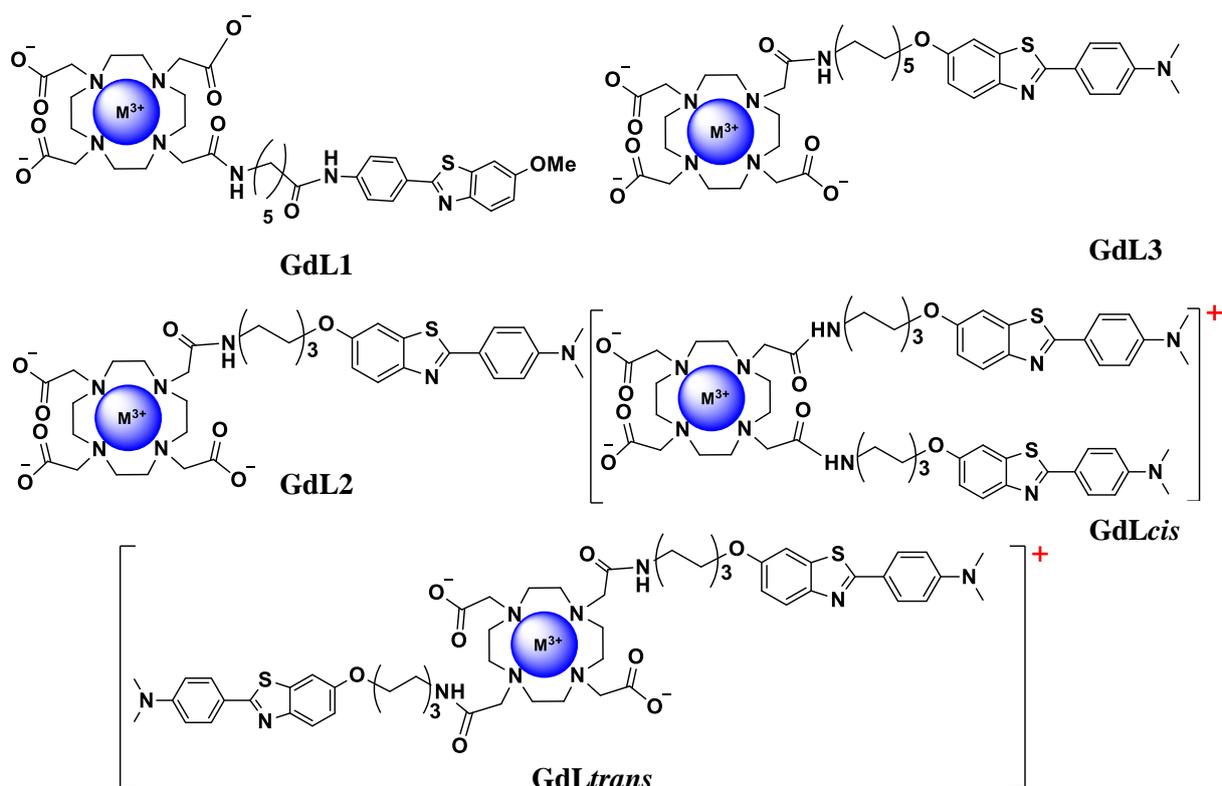


Figure 1 : Les différents complexes étudiés dans la thèse

Deux familles de complexes ont été étudiées, selon le nombre de bras de ciblage sur le ligand.

Conclusion et perspectives

La première famille concerne des complexes avec un bras de ciblage dérivé de PiB. Cette unité de ciblage, présente dans deux positions différentes, est couplée à une unité chélatante de type DO3A-monoamide *via* différents espaceurs. Les différents linkers ont un effet sur la balance hydrophilie/hydrophobie des structures, ce qui se traduit par une forte variation du coefficient de partition octanol/eau, Log P (0.03-1.46). Ce paramètre, connu pour son influence sur l'affinité aux peptides et sur le passage à travers les barrières biologiques, influe également sur la concentration micellaire critique (CMC) de ces complexes amphiphiles.

La CMC a été étudiée par trois techniques complémentaires (relaxométrie, spectroscopie UV-vis, fluorescence) et varie entre la gamme micromolaire (pour GdL3) et la gamme millimolaire (pour GdL1). Ces études ont démontré une grande complexité des systèmes en termes d'agrégation micellaire, également confirmé par les mesures de charge et de taille des particules.

Les interactions entre l'A β ₁₋₄₀ ou l'amyline et les trois complexes GdL1, GdL2 et GdL3, comportant chacun une seule unité de reconnaissance PiB pour les peptides amyloïdes, ont été caractérisées par des études de SPR (Surface Plasmon Resonance) qui ont permis de déterminer des constantes de dissociation. Afin de mieux maîtriser l'état d'agrégation des peptides immobilisés sur le sensorchip, un protocole spécifique a été appliqué et deux niveaux d'immobilisation ont été testés sur le chip. En plus des études SPR, une description plus qualitative des interactions complexe/peptide a été obtenue par des études de dichroïsme circulaire et de relaxométrie.

Dans un premier temps, le modèle Langmuir a été utilisé pour l'analyse des courbes SPR et a permis de calculer des constantes de dissociation globales. Pour les trois complexes, des constantes de dissociation sont de l'ordre de micromolaire, sans sélectivité entre l'A β ₁₋₄₀ et l'amyline. Dans le cas du GdL3, une deuxième constante de dissociation, $K_D = 4.4$ et 4.5 nM, respectivement pour l'A β ₁₋₄₀ ou l'amyline, a pu être déterminée sur les chips fortement chargés en peptides. Ces valeurs sont similaires à celle obtenue pour l'interaction entre la molécule du PiB et l'A β ₁₋₄₀. Ceci montre qu'il est possible d'éviter une baisse d'affinité en utilisant un espaceur long et hydrophobe (C10) entre l'unité d'imagerie et l'unité ciblant. Dans un deuxième temps, la linéarisation Scatchard des courbes SPR a mis en évidence différents régimes d'interaction en fonction de la concentration des complexes. Ces régimes d'interaction semblent être liés aux différentes structures des agrégats micellaires présentes dans la solution des complexes, indiquées par des CMC déterminées, même si l'hypothèse

Conclusion et perspectives

d'avoir plusieurs sites d'interaction sur les peptides ne peut pas être écartée non plus. Différents régimes d'interaction ont été également observés lors de l'étude de dichroïsme circulaire, utilisée pour suivre l'agrégation des peptides dans le temps et en présence des complexes à différentes concentrations.

Les biodistributions *ex vivo* des complexes $^{111}\text{InL2}$ et $^{111}\text{InL3}$ sur des souris saines ont révélé différentes voies d'élimination des deux complexes : l'élimination de l' $^{111}\text{InL2}$ se fait par voie rénale, alors que le $^{111}\text{InL3}$, plus lipophile, s'élimine par voie intestinale/ biliaire. L'accumulation des deux complexes dans le pancréas est relativement importante et cette quantité peut être suffisante pour les études *in vivo* sur des souris modèles exprimant l'amyline humaine. Les résultats de biodistribution montrent également une dépendance possible de la concentration, et donc de l'état d'agrégation des complexes dans la solution utilisée pour l'injection.

Dans la deuxième partie de cette thèse, deux nouveaux ligands comportant deux bras de ciblage en position *cis* ou *trans* sur l'unité chélatante, attachés par l'intermédiaire d'un espaceur de 6 chaînons, ont été synthétisés. La faible solubilité de leur complexe de Gd(III) qui ne dépasse pas $25\mu\text{M}$ a limité la détermination de la CMC à deux techniques complémentaires, l'UV-vis et la fluorescence. En comparant GdL2 et GdL*trans*, il a été possible de montrer que l'ajout d'un bras a une légère influence sur la lipophilie, exprimée par le log P. Pour GdL*cis*, une diminution du log P a été observée en augmentant la concentration, un phénomène que nous estimons être lié à la structure des agrégats dans la solution.

Dans le cas des deux complexes, les études SPR ont démontré une sélectivité tout à fait remarquable, de deux ordres de grandeur, pour l'amyline par rapport à l'A β_{1-40} . GdL*trans* et GdL*cis* possèdent une bonne affinité pour l'amyline, ($K_D = 0.15\mu\text{M}$ et $0.73\mu\text{M}$, respectivement) exprimant un gain significatif par rapport au résultat obtenu avec le complexe GdL₂ ($K_D = 17.2\mu\text{M}$).

Les résultats de ces travaux contribuent avant tout à une meilleure compréhension des interactions entre complexes métalliques et peptides amyloïdes. Aujourd'hui, des complexes métalliques sont largement étudiés comme potentiels sondes d'imagerie pour la détection des peptides amyloïdes, mais également comme agents thérapeutiques pour empêcher l'agrégation des peptides. La plupart de ces complexes sont des molécules amphiphiles qui peuvent former des agrégats micellaires en solution. Nos résultats laissent conclure que ces

Conclusion et perspectives

phénomènes d'agrégation peuvent avoir une influence importante sur l'interaction entre le complexe et les peptides et peuvent également affecter la biodistribution.

Pour compléter nos résultats, il serait important de faire des études *in vivo* de biodistribution avec les complexes de $^{111}\text{In(III)}$ des deux ligands *Lcis* et *Ltrans*. En parallèle, un travail d'optimisation de leur structure chimique serait nécessaire afin d'augmenter la solubilité aqueuse de ces complexes avec deux unités de ciblage. Cela pourrait se faire en ajoutant des groupements plus hydrophiles comme des sucres, ou en changeant la nature du bras de ciblage (Figure 2), tout en gardant les linkers de chaînes alkyles qui donnent le caractère hydrophobe indispensable pour l'interaction avec les fibres amyloïdes. Enfin, il serait aussi important à considérer la substitution du Gd(III) par un métal plus biocompatible, comme le Mn(II), pour développer des agents de contraste IRM plus sûrs. Pour cela, l'unité chélatante du métal devra être adaptée au Mn(II). Il est peu probable que nous puissions améliorer la solubilité des molécules portant deux bras de ciblage jusqu'à atteindre des concentrations adaptées à l'IRM, sans modifier leurs propriétés envers les fibres amyloïdes. Ce type de molécule semble plutôt destiné à l'imagerie nucléaire.

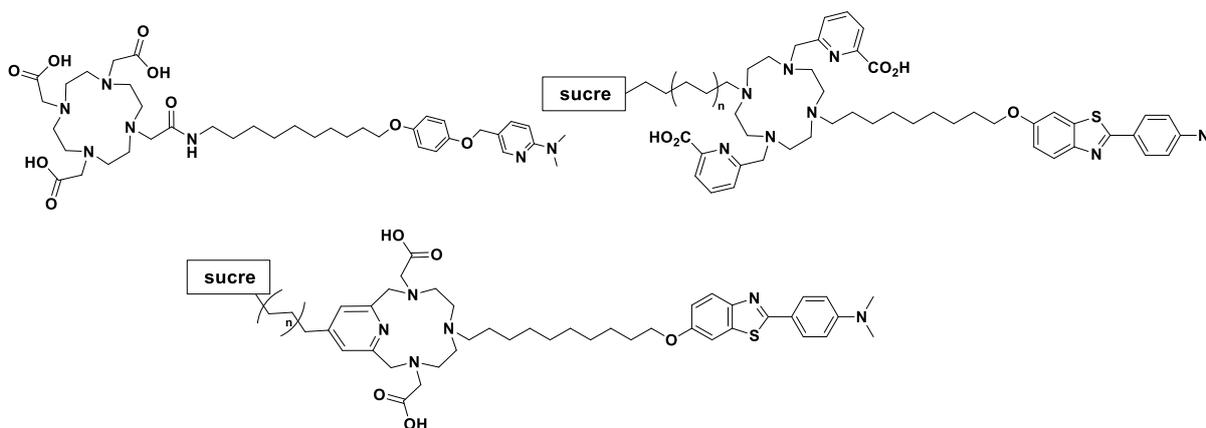


Figure 2 : Propositions de nouvelles structures

Pour les molécules les plus prometteuses ayant une bonne affinité et une sélectivité à l'amyline, une évaluation biologique plus poussée, *in vivo* sur des modèles de souris transgéniques diabétiques exprimant l'amyline humaine ou *in vitro* sur des tissus de pancréas humains devrait être menée. Elle seule permettra une vraie validation de la stratégie de design de ces sondes pour la détection des plaques amyloïdes dans le pancréas.

Dans une perspective plus longue, il serait important de parvenir à une sonde d'imagerie sélective à l'amyline. Une telle sonde serait utile dans la recherche biomédicale pour mieux

Conclusion et perspectives

comprendre l'évolution de la maladie de diabète de type II, mais aussi pour son diagnostic précoce. Un agent d'imagerie permettant de visualiser les plaques amyloïdes au niveau de pancréas pourrait également contribuer à suivre des traitements préventifs avant la perte massive de la cellule bêta dans les ilots de Langerhans conduisant à une dépendance d'injection d'insuline à vie.

Partie expérimentale

Pour que ce chapitre soit accessible à un plus grand public, nous avons choisi de le rédiger en anglais. Ce chapitre présentera l'aspect technique de la thèse, le matériel et les méthodes ainsi que les protocoles de synthèse des ligands.

In order to make this chapter more accessible to a larger audience, it will be written in English. This chapter will present the technical aspects of the thesis, the materials and methods, besides the synthesis protocols of ligands.

1. Experimental procedures and materials:

1.1 Solvents and reagents:

All commercial reagents and solvents were provided from different suppliers: Alfa-Aeser, CheMatech, Fisher Scientific, Sigma-Aldrich and TCI Chemicals, and were used without further purifications. The solvents used for reactions were anhydrous most of the time.

A β ₁₋₄₀ and amyline peptides were purchased from Euregentec and provided with chromatograms to make sure of the purity of the samples.

The synthesized compounds were analyzed systematically by ¹H and ¹³C NMR and by High Resolution Mass Spectroscopy (HRMS) performed on a Bruker maXis mass spectrometer. ¹H and ¹³C spectra were recorded at 600 MHz on a Bruker Advance Spectrometer using a 5mm BBFO probe. Appropriate deuterated solvents were used in these analyses.

The reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) on silica gel F254 plates. The plates were revealed by the use of an ultraviolet lamp (254 nm, 365nm) and/or by using chemical dyes such as ninhydrin to reveal amines, or Dragendorff's solution for macrocyclic compounds.

Flash chromatography was performed using an Interchim flash chromatography Spot II device.

1.2 Synthesis

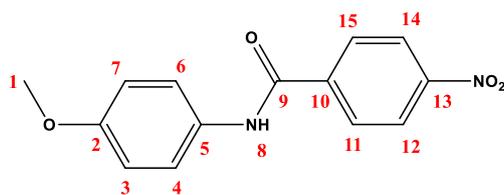
The experimental procedures from compound 2 to ligand L2 have been reported in the literature^{1,2,3}.

¹ André F. Martins et al., « Gd³⁺ Complexes Conjugated to Pittsburgh Compound B: Potential MRI Markers of β -Amyloid Plaques », *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 19, n° 2 (février 2014): 281- 95, <https://doi.org/10.1007/s00775-013-1055-8>.

² André F. Martins et al., « Associating a Negatively Charged GdDOTA-Derivative to the Pittsburgh Compound B for Targeting A β Amyloid Aggregates », *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 21, n° 1 (mars 2016): 83- 99, <https://doi.org/10.1007/s00775-015-1316-9>.

³ Pedro Miguel Costa et al., « Functionalised Carbon Nanotubes Enhance Brain Delivery of Amyloid-Targeting Pittsburgh Compound B (PiB)-Derived Ligands », *Nanotheranostics* 2, n° 2 (2018): 168- 83, <https://doi.org/10.7150/ntno.23125>.

Compound 2 :N-(4'-methoxyphenyl)-4-nitrobenzamide:



Chemical Formula: $C_{14}H_{12}N_2O_4$

Molecular Weight: 272,2600

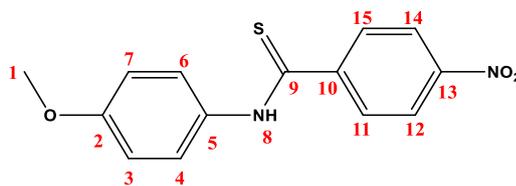
To a solution of 60 ml of p-anisidine (3.08 g, 25 mmol) and dry triethylamine (3.48 ml, 25 mmol) in anhydrous THF, was added dropwise at 0°C, 30 ml of a solution of 4-nitrobenzoyl chloride (3.03 ml, 25 mmol) in dry THF over 20 minutes. The mixture was stirred 1h at 0°C then 1h at room temperature. The white precipitate was filtered and the solution was concentrated under vacuum to 30 ml. Then 50 ml of water was added and the solution was allowed to stand at 4°C overnight. The yellow-green precipitate was filtered and dry under vacuum to give 6.53 g of compound **2** (96 %).

1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.27 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 2H, H12, H14), 7.97 (d, $^3J = 8.5$ Hz, 2H, H11, H15), 7.47 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 2H, H4, H6), 7.70 (d, 1H, H8), 6.86 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 2H, H3, H7), 3.76 (s, 3H, H1).

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 163.4 (C9), 155.9, (C2), 149.1 (C13), 140.7 (C10), 131.8 (C5), 128.2 (C12, C14), 123.5 (C11, C15), 122.3 (C4, C6), 114.4 (C3, C7), 55.6 (C1).

HRMS: calc. for $C_{14}H_{12}N_2O_4$ $[M+H]^+ = 273.0870$, found $[M+H]^+ = 273.0869$.

Compound 3: N-(4'-methoxyphenyl)-4-nitrothiobenzamide:



Chemical Formula: C₁₄H₁₂N₂O₃S
Molecular Weight: 288,3210

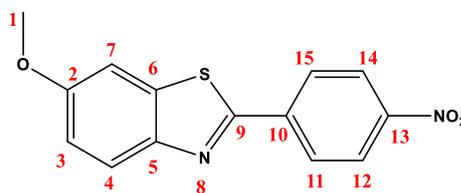
3 g (11 mmol) of compound **2** was dissolved in 15 ml of chlorobenzene. Then 2.67 g (6.6 mmol) Lawesson's reagent was added to the solution and the mixture was refluxed 4h. After cooling, the solution was allowed to stand overnight at 0°C. The orange precipitate was filtered and then dissolved in acetone to separate the residue of Lawesson's reagent. The solution was evaporated to dryness to give 2.389 g (8.3 mmol) of the N-(4'-methoxyphenyl)-4-nitrothiobenzamide. Yield: 75%.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.88 (s, 1H, H8), 8.22 (d, ³J = 8.7 Hz, 2H, H3, H4), 7.91 (d, ³J = 7.9 Hz, 2H, H2, H5), 7.59 (d, ³J = 8.9 Hz, 2H, H11, H15), 6.92 (d, ³J = 9.0 Hz, 2H, H12, H14), 3.79 (s, 3H, H1).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 191.5 (1C, C9), 158.7 (1C, C2), 147.9 (C10), 132.6 (C5), 127.9 (2C, C11, C15), 125.7 (2C, C12, C14), 124.0 (2C, C4, C6), 114.3 (2C, C3, C7), 55.6 (1C, C1).

HRMS: calc. for C₁₄H₁₂N₂O₃S [M+H]⁺ =289.0642, found [M+H]⁺ =289.0486.

Compound 4: 2-(4'-nitrophenyl)-6-methoxybenzothiazol:



Chemical Formula: C₁₄H₁₀N₂O₃S
Molecular Weight: 286,3050

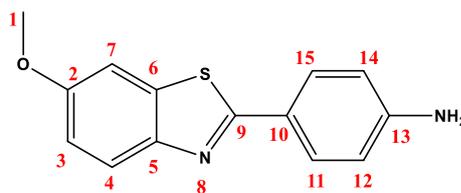
2.353 g (8.1 mmol) of compound **3** was wetted with 3 ml of ethanol and then 15 ml of 10% aqueous NaOH was added. The mixture was diluted with water to provide a final suspension of 5% aqueous NaOH. The mixture was slowly added over 45 minutes into a refluxed solution of 10.674 g (32.49 mmol) potassium hexacyanoferrate(III) in water. Then the mixture was refluxed 3h. The brown precipitate was filtered and dried under vacuum and 100 ml of a mixture of dichloromethane-methanol (75/25, v/v) was added. The solid was filtered off and the solvent was evaporated. Then a 100 ml of a mixture of chloroform-methanol (20/80, v/v) was added and the brown-yellow precipitate was filtered. The solution was evaporated to dryness to give 1.258 g (4.38 mmol) of **compound 4** (54%).

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ(ppm) 8.27 (d, ³J = 8.9 Hz, 2H, H12, H14), 8.14 (d, ³J = 8.8Hz, 1H, H4), 7.93 (d, ³J = 8.9 Hz, 2H, H11, H15), 7.31 (d, ⁴J = 2.6 Hz, 1H, H7), 7.08 (dd, 1H, ³J = 8.9 Hz, ⁴J = 2.6 Hz, H3), 3.85 (s, 3H, H1).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 56.0 (1C, C1), 104.0 (1C, C7), 116.8 (1C, C3), 124.5 (2C, C14, C12), 124.7 (1C, C4), 128.0 (2C, C15, C11), 137.1 (1C, C6), 139.4 (1C, C13), 148.7 (1C, C5), 148.8 (1C, C10) 158.6 (1C, C2), 162.4 (1C, C9).

HRMS: calc. for C₁₄H₁₀N₂O₃S [M+H]⁺ =287.0485, found [M+H]⁺ =287.0483.

Compound 5: 2-(4'-aminophenyl)-6-methoxybenzothiazol:



Chemical Formula: C₁₄H₁₂N₂OS

Molecular Weight: 256,3230

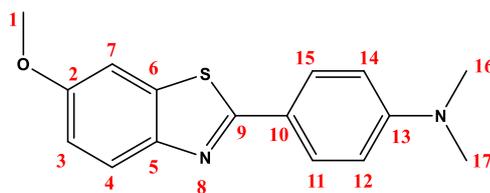
To a solution of 1,228 g (4.29 mmol) compound **4** in 120 ml of ethanol, 5.954 g (26.39 mmol) Tin(II) chloride dihydrate was added and the mixture was refluxed for 4h. The ethanol was evaporated and the residue was dissolved in ethyl-acetate. The resulting solution was washed 3 times with an aqueous solution of 1M of NaOH and the organic phase was collected and washed 2 times with 25 ml of water. The organic phase was collected, dried over MgSO₄ and the solvent was evaporated. The crude product was purified by flash chromatography with (CH₂Cl₂/EtOAc, 8:1). The solution was evaporated to dryness to give 0.992 g of compound **5** (90%).

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ(ppm) 7.80 (d, ³J = 8.9 Hz, 1H, H4), 7.77 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H, H11, H15), 7.25 (d, ⁴J = 2.7 Hz, 1H, H7), 6.97 (dd, 1H, ³J = 8.9 Hz, ⁴J = 2.4 Hz, H3), 6.66 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H, H12, H14), 3.91 (bs, 2H, NH₂), 3.81 (s, 3H, H1).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ(ppm) 166.2 (1C, C9), 157.2 (1C, C2), 149.9 (1C, C5), 148.8 (1C, C10), 135.9 (1C, C6), 128.8 (2C, C11, C15), 124.2 (1C, C4), 122.9 (1C, C13), 115.1 (2C, C12, C14), 114.9 (1C, C3), 104.3 (1C, C7), 55.8 (1C, C1).

HRMS: calc. for C₁₄H₁₂N₂OS [M+H]⁺ =257.0743, found [M+H]⁺ =257.0741.

Compound 6: 4-(6-methoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-N,N-dimethylaniline



Chemical Formula: C₁₆H₁₆N₂OS

Molecular Weight: 284,3770

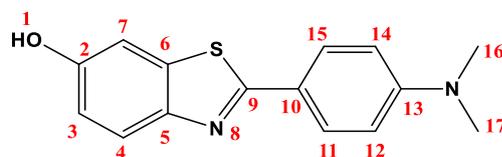
In a round flask, 4-(6-methoxybenzo[d]thiazol-2-yl)aniline **5** (500mg, 1.95 mmol) and paraformaldehyde (600mg, 20 mmol) were dissolved in 50ml of acetic acid. After 1h at room temperature, sodium cyanoborohydride (400mg, 6.36mmol) was added and the solution was mixed overnight. The reaction was neutralised by adding ammonium hydroxide. A yellowish precipitate was formed, collected and washed with water to give, without further purifications, 538mg (97%) of compound **6**.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ(ppm) 7.93 (d, ³J = 8.9 Hz, 1H, H5), 7.89 (d, ³J = 8.9 Hz, 2H, H11, H15), 7.34 (d, ⁴J = 2.5 Hz, 1H, H7), 7.06 (dd, 1H, ³J = 9 Hz, ⁴J = 2.5 Hz, H3), 6.77 (d, ³J = 8.9 Hz, 2H, H12, H14), 3.90 (s, 3H, H1), 3.07 (s, 6H, H16, H17).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 166.7 (1C, C9), 155.9 (1C, C2), 152.2 (1C, C5), 149.1 (1C, C10), 136.0 (1C, C6), 128.6 (2C, C11, C15), 122.7 (1C, C4), 121.8 (1C, C13), 114.9 (1C, C3), 111.7 (2C, C12, C14), 104.4 (1C, C7), 55.8 (1C, C1), 40.3 (2C, C16, C17).

HRMS: calc. for C₁₆H₁₆N₂OS [M+H]⁺ = 285.1056, found [M+H]⁺ = 285.1055.

Compound 7: 2-(4-(dimethylamino)phenyl)benzo[d]thiazol-6-ol



Chemical Formula: C₁₅H₁₄N₂OS

Molecular Weight: 270,35

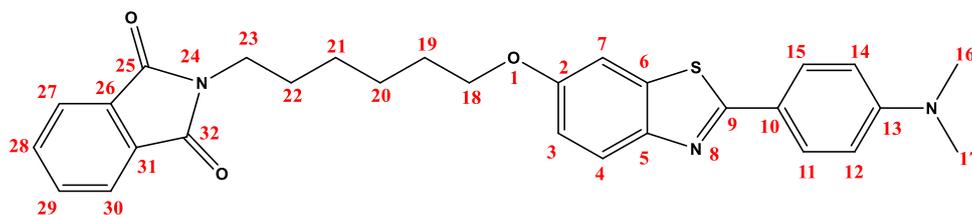
Compound **6** (500 mg, 1.76 mmol) was dissolved in 12ml of dichloromethane at 0°C and 4ml of boron tribromine 1M were added dropwise. The solution was mixed for 3h and neutralised by adding a solution of sodium hydroxide 1N and the extraction was made with ethyl acetate (3X 30ml). The organic fraction was collected, dried over magnesium sulfate and evaporated to give, without further purifications, 471mg (99%) of compound **7**.

¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ(ppm) 9.71 (s, 1H, H1), 7.81 (d, ³J = 9.0 Hz, 2H, H11, H15), 7.72 (d, ³J = 8.8 Hz, 1H, H4), 7.34 (d, ³J = 2.6 Hz, 1H, H7), 6.90 (dd, 1H, ³J = 8.8 Hz, ⁴J = 2.6 Hz, H3), 6.81 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H, H12, H14), 3.01 (s, 6H, H16, H17)

¹³C NMR (150 MHz, DMSO): δ(ppm) 164.6 (1C, C9), 154.4 (1C, C2), 152.3 (1C, C5), 147.6 (1C, C10), 135.7 (1C, C6), 128.7 (2C, C11, C15), 122.9 (1C, C4), 121.3 (1C, C13), 114.7 (1C, C3), 112.4 (2C, C12, C14), 103.6 (1C, C7), 40.2 (1C, C16), 40.4 (1C, C17).

HRMS: calc. for C₁₅H₁₄N₂OS [M+H]⁺ =271.0900, found [M+H]⁺ =271.0890.

Compound 8: 2-(6-((2-(4-(dimethylamino)phenyl)benzo[d]thiazol-6-yl)oxy)hexyl)isoindoline-1,3-dione:



Chemical Formula: C₂₉H₂₉N₃O₃S
Molecular Weight: 499,6290

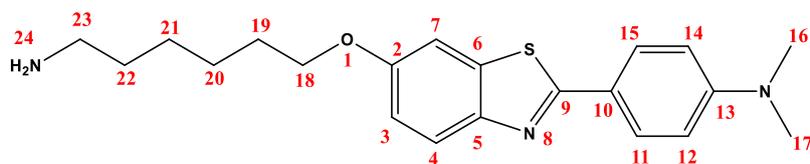
To a solution of N-(6-Bromohexyl)phthalimide (860mg, 2.77mmol) in 60ml of acetone were added 1g of potassium carbonate and a solution of compound **7** (450mg, 1,66mmol) in 10ml of acetone. The mixture was refluxed 3 days. After cooling down to room temperature, the solid was filtered off and the solvent was evaporated. Crude product was dissolved in 5ml of dichloromethane and petroleum ether was added until precipitation. The white solid was isolated to give 715mg (86%) of compound **8**.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.91 (d, ³J = 9.1 Hz, 2H, H26, H27), 7.84 (m, 3H, H4, H25, H28), 7.70 (dd, 2H, ³J = 5.4 Hz, ⁴J = 3.0 Hz, H11, H15), 7.29 (d, ⁴J = 2.4 Hz, 1H, H7), 7.02 (dd, 1H, ³J = 8.9 Hz, ⁴J = 2.6 Hz, H3), 6.74 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, H12, H14), 4.03 (t, 2H, ³J = 6.5 Hz, H18), 3.72 (t, 2H, ³J = 7.2 Hz, H23), 3.04 (s, 6H, H16, H17), 1.82 (m, 2H, H18), 1.75 (m, 2H, H22), 1.55 (m, 2H, H20), 1.45 (m, 2H, H21).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 168.5 (2C, C30, C31), 166.5 (1C, C9), 156.6 (1C, C2), 151.9 (1C, C10), 151.8 (1C, C5), 135.7 (1C, C6), 133.9 (2C, C26, C27), 132.1 (2C, C24, C29), 128.5 (2C, C11, C15), 124.3 (1C, C4), 122.6 (2C, C25, C28), 121.6 (1C, C13), 115.4 (1C, C3), 111.8 (2C, C12, C14), 105.1 (1C, C7), 68.2 (1C, C18), 40.2 (2C, C16, C17), 37.5 (1C, C23), 29.3 (1C, C19), 28.2 (1C, C22), 27.1 (1C, C21), 25.9 (1C, C20).

HRMS: calc. for C₂₉H₂₉N₃O₃S [M+H]⁺ =500.2003, found [M+H]⁺ =500.199.

Compound 9 : 4-(6-((6-aminohexyl)oxy)benzo[d]thiazol-2-yl)-N,N-dimethylaniline:



Chemical Formula: C₂₁H₂₇N₃OS
Molecular Weight: 369,5270

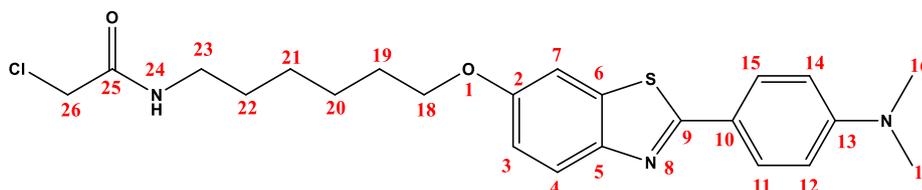
Compound **8** (700mg, 1.40mmol) was refluxed 2h in 15 ml of hydrazine hydrate. After cooling down, product was extracted with dichloromethane (3 x 30ml) and the organic fraction was washed twice with 10 ml of brine. The organic phase was dried over magnesium sulphate and evaporated to afford to 512mg (99%) of compound **9** as a yellow oil.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) : δ(ppm) 7.80 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H, H11, H15), 7.76 (d, ³J = 8.8 Hz, 1H, H4), 7.19 (d, ⁴J = 2.3 Hz, 1H, H7), 6.93 (dd, 1H, ³J = 8.9 Hz, ⁴J = 2.5 Hz, H3), 6.62 (d, 2H, ³J = 8.9 Hz, H12, H14), 3.89 (t, 2H, ³J = 6.6 Hz, H18), 2.92 (s, 6H, H16, H17), 2.6 (t, 2H, H23), 1.72 (m, 2H, H19), 1.38 (m, 4H, H20, H21), 1.30 (m, 2H, H22).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 166.4 (1C, C9), 156.6 (1C, C2), 151.9 (1C, C10), 148.8 (1C, C5), 135.7 (1C, C6), 128.5 (2C, C11, C15), 122.7 (1C, C4), 121.6 (1C, C13), 115.4 (1C, C3), 111.7 (2C, C12, C14), 105.1 (1C, C7), 68.5 (1C, C18), 42.1 (1C, C23), 40.2 (2C, C16, C17), 33.7 (1C, C22), 29.3 (1C, C19), 26.8 (1C, C21), 25.9 (1C, C20).

HRMS: calc. for C₂₁H₂₇N₃OS [M+H]⁺ =370.1948, found [M+H]⁺ =370.1946
[M+2H]⁺=371.2032.

Compound 10 : 2-chloro-N-(6-((2-(4-(dimethylamino)phenyl)benzo[d]thiazol-6-yl)oxy)hexyl)acetamide:



Chemical Formula: $C_{23}H_{28}ClN_3O_2S$
Molecular Weight: 446,0060

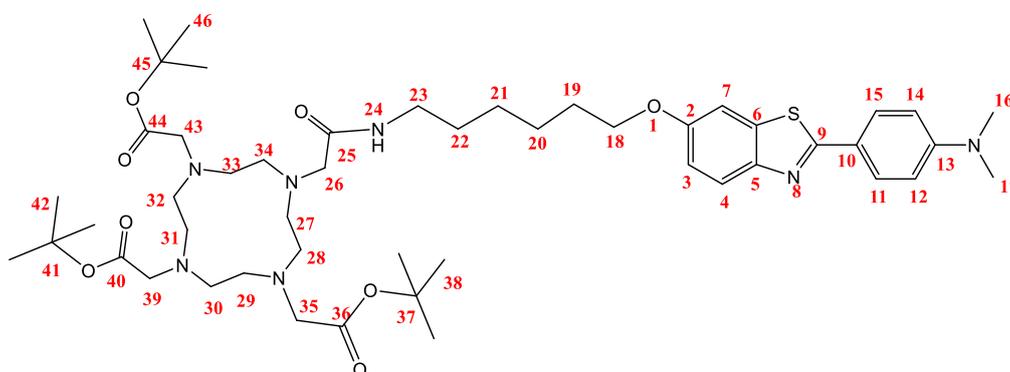
To a solution of compound 9 (500mg, 1.35mmol) and triethylamine (565 μ l, 4.06mmol) in 15ml of dry THF at 0°C, was added dropwise a solution of chloroacetyl chloride (650 μ l, 4.06mmol) in 5 ml of dry THF. The mixture was stirred 3H and 60 ml of water was added. The solution was stored at 4°C overnight. Yellowish crystals were filtered off to give 499mg (83%) of compound 10.

1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7.83 (d, $^3J = 8.9$ Hz, 2H, H11, H15), 7.77 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 1H, H4), 7.22 (d, $^4J = 2.4$ Hz, 1H, H7), 6.94 (dd, 1H, $^3J = 9.1$ Hz, $^4J = 2.6$ Hz, H3), 6.66 (d, 2H, $^3J = 9.1$ Hz, H12, H14), 3.97 (s, 2H, H26), 3.94 (t, 2H, $^3J = 6.5$ Hz, H18), 3.25 (q, 2H, $^3J = 7.1$ Hz, H23), 2.97 (s, 6H, H16, H17), 1.75 (t, 2H, $^3J = 7.1$ Hz, H19), 1.55-1.43(bs, 4H, H20, H22), 1.36 (bs, 2H, H21).

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 166.4 (1C, C9), 165.8 (1C, C25), 156.6 (1C, C2), 151.9 (1C, C10), 148.9 (1C, C5), 135.8 (1C, C6), 128.5 (2C, C11, C15), 122.7 (1C, C4), 121.7 (1C, C13), 115.4 (1C, C3), 111.8 (2C, C12, C14), 105.2 (1C, C7), 68.4 (1C, C18), 42.8 (1C, C26), 40.2 (2C, C16, C17), 39.9 (1C, C23), 29.4 (1C, C19), 29.1 (1C, C22), 26.8 (1C, C21), 25.9 (1C, C20).

HRMS: calc. for $C_{23}H_{28}ClN_3O_2S$ $[M+H]^+ = 447.1737$, found $[M+H]^+ = 447.1500$.

Protected ligand L2 : tert-butyl 2-[4,7-bis(2-tert-butoxy-2-oxo-ethyl)-10-[2-[10-[[2-[4-(dimethylamino)phenyl]-1,3-benzothiazol-6-yl]oxy]hexylamino]-2-oxo-ethyl]-1,4,7,10-tetrazacyclododec-1-yl]acetate



Chemical Formula: C₄₉H₇₇N₇O₈S
Molecular Weight: 924,2560

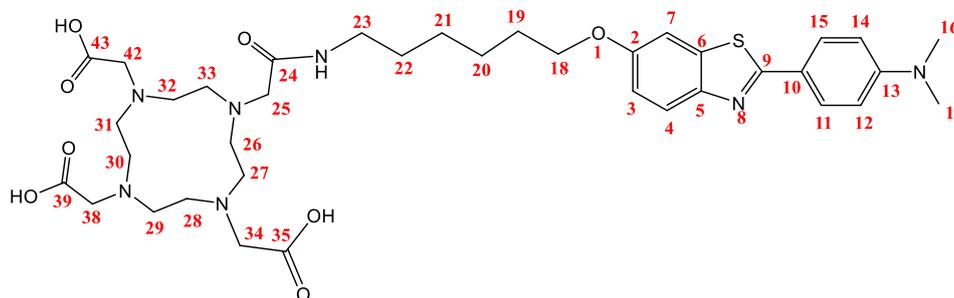
To a solution of DO3A-tBu (300mg, 0.58mmol) and potassium carbonate (226 mg, 2 mmol) in 20 mL of dry acetonitrile was added a solution of **10** (310mg, 0.7 mmol) in 15 mL of dry acetonitrile. The reaction mixture was stirred for 16 h at 90°C. After cooling, the solid was filtered off and the solvent was evaporated. The crude product was purified by flash chromatography (eluent: ethyl acetate/methanol 95/5) and 407mg (76%) of product **L2** were isolated as a yellow oil.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) : 7.90 (d, ³J = 8.9 Hz, 2H, H11, H15) , 7.62 (3, 1H, H24) ,7.31 (d, ⁴J= 2.4Hz,1H, H7), 7.01 (dd, 1H ³J= 8.9Hz, ⁴J= 2.4Hz, H3), 6.74 (d, 2H, ³J= 8.9Hz, H12, H14), 3.99 (t, ³J= 6.4Hz, 2H, H26), 3.39 (bs, 6H, H35, H39, H43), 3.22 (dt, ³J=6.1Hz, ³J= 5.9Hz, 2H, H23), 3.05 (s, 6H, H16, H17), 2.85 (bs, 4H, H27, H28), 2.55 (bs, 4H, H33, H34), 2.25 (bs, 8H, H29, H30, H31, H32), 1.81 (m, 2H, H20), 1.61 (m, 2H, H22), 1.48 (m, 2H, H19), 1.45 (s, 9H, H42), 1.44 (s, 18H, H38, H46), 1.40 (m, 2H, H21).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): 172.1 (1C, C40), 171.8 (2C, C44, C36), 171.0 (1C, C25), 165.9 (1C, C10), 156.3(1C, C2), 151.5 (1C, C13), 148.3 (1C, C5), 135.3 (1C, C6), 128.1 (2C, C11,C15), 122.1 (1C, C4), 120.9 (1C, C13), 115.1 (1C, C3), 111.3 (2C, C12,C14) , 104.7 (1C, C7), 81.3 (1C, C41), 81.2 (2C, C37,C45), 68.2 (1C, C18), 56.0 (1C, C26), 55.3 (1C, C39) , 55.1 (2C, C35,C43) , 52.0 (2C, C29,C32), 48.1 (4C, C27, C28, C33, C34), 39.9 (2C, C16, C17) , 38.7 (1C, C23), 29.1 (1C, C22), 28.8 (1C, C20), 27.6 (2C, C37, C46), 27.5 (1C, C42), 26.4 (1C, C21), 25.4 (1C, C19).

HRMS: calc. for C₄₉H₇₇N₇O₈S [M+H]⁺ =924.5627, found [M+H]⁺ =924.5622.

Ligand L2 :2-[4,7-bis(carboxymethyl)-10-[2-[10-[[2-[4-(dimethylamino)phenyl]-1,3-benzothiazol-6-yl]oxy]hexylamino]-2-oxo-ethyl]-1,4,7,10-tetrazacyclododec-1-yl]acetic acid (L2)



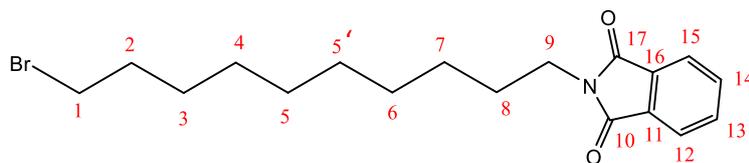
Chemical Formula: C₃₇H₅₃N₇O₈S
Molecular Weight: 755,9320

To a solution of the **protected ligand L2** (350mg, 0.38mmol) in 10 ml of dichloromethane was added 10ml of trifluoroacetic acid. The solution was stirred 3h at room temperature and the solvents were evaporated. The crude product was purified by flash chromatography on RPC18 silica (eluent: H₂O/Methanol). 207mg (82%) of ligand **L2** were isolated as a yellow powder.

¹H NMR (600 MHz, D₂O): 7.33 (d, 2H, H11, H15), 6.95 (bs, 1H, H4) , 6.51 (bs, 1H, H7) , 6.06 (bs, 1H, H3), 5.66 (bs, 2H, H12, H14), 3.74 (bs, 4H, H38, H25) , 3.57 (bs, 4H, H34, H42) , 3.10-3.26 (bs, 20H, H28-33, H23, H16, H17), 2.28 (bs, 6H, H18, H26, H27), 1.28 (bs, 4H, H20, H22) , 1.03 (bs, 4H, H21, H19).

HRMS: calc. for C₃₇H₅₃N₇O₈S [M+H]⁺=757.3822, found [M+2H]²⁺=757.3824 and [M+3H]³⁺=758.3910.

Compound 12: 2-(10-bromodecyl)isoindoline-1,3-dione⁴



Chemical Formula: C₁₈H₂₄BrNO₂
Molecular Weight: 366,30

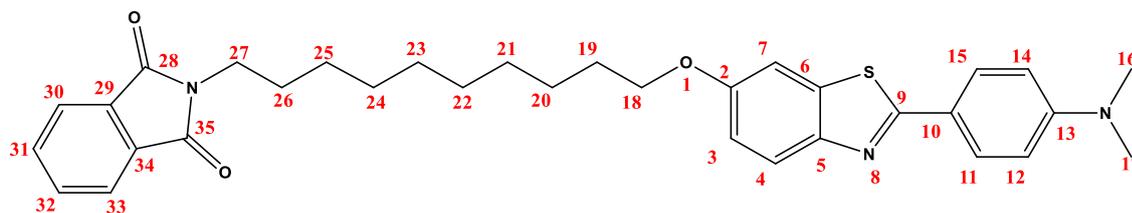
To a solution of 1,10-dibromodecane (11g, 36.6mmol) in 20 ml of DMF in presence of 2g of potassium carbonate, potassium phthalimide (1g, 5.4mmol) is added. The suspension is stirred for 18h at 90 °C. After cooling down, the solid is filtered off and the crude product is purified by flash chromatography (cyclohexane 100%, then dichloromethane 100%) to afford 2g of compound **12** (98%).

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): 7.83 (m, H13, H14), 7.77 (m, H12, H15), 3.67 (t, ³J= 7.4Hz, 2H, H9), 3.39 (t, ³J= 6.9Hz, 2H, H1), 1.84 (m, 2H, H2), 1.67 (m, 2H, H8), 1.39 (m, 2H, H3), 1.33 (m, 4H, H4, H7), 1.28 (m, 4H, H5, H6).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) 168.3 (2C, C10, C17), 133.8 (2C, C13, C14), 132.1 (2C, C11, C16), 123.0 (2C, C12, C15), 38.0 (1C, C9), 33.9 (1C, C8), 32.8 (1C, C2), 29.2 (1C, C6), 29.1 (1C, C5), 26.8 (1C, C7), 28.7 (1C, C4), 28.5 (1C, C3), 28.1 (1C, C1).

⁴ Robert C. Elderfield et al., « Aminoalkylamino Derivatives of 8-Aminoquinoline ¹ », *Journal of the American Chemical Society* 68, n° 8 (août 1946): 1568- 69, <https://doi.org/10.1021/ja01212a056>.

Compound 13: 2-[10-[[2-[4-(dimethylamino)phenyl]-1,3-benzothiazol-6-yl]oxy]decyl]isoindoline-1,3-dione



Chemical Formula: C₃₃H₃₇N₃O₃S

Molecular Weight: 555,74

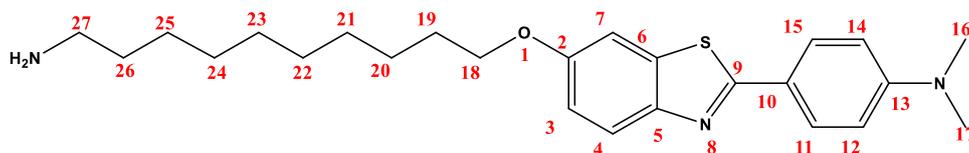
To a solution of compound **12** (1.825mg, 5mmol) in 60ml of acetone, 1g of potassium carbonate and a solution of compound **3** (450mg, 1,66mmol) in 10ml of acetone was added. The mixture was refluxed 3 days. After cooling down to room temperature, the solid was filtered off and the solvent was evaporated. Crude product was dissolved in 5ml of dichloromethane and petroleum ether was added until precipitation. The white solid was isolated to give 715mg (77%) of compound **13**.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): 7.90 (d, ³J= 8.9Hz, 4H, H30-H33), 7.84 (d, ³J= 8.9Hz, 1H, H4), 7.70 (m, 2H, H11, H15), 7.32 (d, ⁴J= 2.5Hz, 1H, H7), 7.03 (dd, ³J= 8.9Hz, ⁴J= 2.5Hz, 1H, H3), 6.74 (d, ³J= 8.9Hz, 2H, H12, H14), 4.00 (t, ³J= 6.7Hz, 2H, H18), 3.67 (t, ³J= 7.5Hz, 2H, H27), 3.04 (s, 6H, H16, H17), 1.80 (m, 2H, H19), 1.67 (m, 2H, H26), 1.46 (m, 2H, H20), 1.34 (m, 6H, H21, H24, H25), 1.31 (m, 4H, H22, H23).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): 168.3 (2C, C28, C35), 166.5 (1C, C9), 156.9 (1C, C2), 152.1(1C, C10), 149.0(1C, C5), 136.0 (1C, C6), 134.0 (2C, C31, C32), 132.4 (2C, C29, C34), 128.6 (2C, C11, C15), 123.5 (2C, C30, C33), 122.9(1C, C4), 121.9 (1C, C13), 115.6 (1C, C3), 112.0 (2C, C12, C14), 105.3 (1C, C7), 68.9 (1C, C18), 40.4 (2C, C16, C17), 38.2 (1C, C27), 29.6 (1C, C21), 29.5 (1C, C19), 29.4 (1C, C24), 29.3 (1C, C22), 28.8 (1C, C26), 27.0(1C, C25), 26.2 (1C, C20).

HRMS: calc. for C₃₃H₃₇N₃O₃S [M+H]⁺ =556.2629, found [M+H]⁺ =556.2624.

Compound 14: 4-[6-(10-aminodecoxy)-1,3-benzothiazol-2-yl]-N,N-dimethyl-aniline



Chemical Formula: C₂₅H₃₅N₃OS

Molecular Weight: 425,64

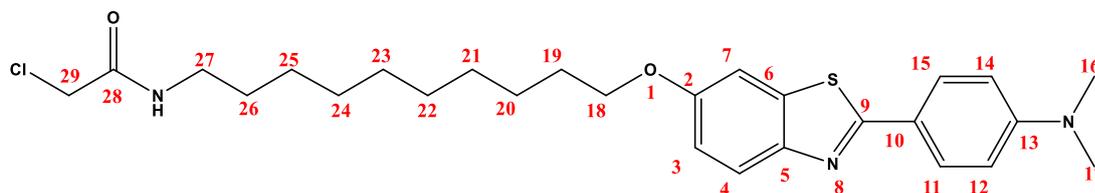
A solution of compound **13** (700mg, 1.26mmol) in 15 ml of hydrazine hydrate was refluxed for 3h at 1209°C. After cooling down, product was extracted with dichloromethane (3 x 30ml) and the organic fraction was washed twice with 10 ml of brine. The organic phase was dried over magnesium sulfate and evaporated to afford to 512mg (95%) of compound **14** as a yellow oil.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): 7.79 (d, ³J= 8.9Hz, 2H, H11, H15), 7.75 (d, ³J= 8.9Hz, 1H, H4), 7.19 (d, ⁴J= 2.5Hz, 1H, H7), 6.92 (dd, ³J= 8.9Hz, ⁴J= 2.5Hz, 1H, H3), 6.61 (d, ³J= 8.9Hz, 2H, H12, H14), 3.88 (t, ³J= 6.6Hz, 2H, H18), 3.04 (s, 6H, H16, H17), 2.58 (m, 2H, H27), 1.70 (m, 2H, H19), 1.34 (m, 4H, H20, H26), 1.24 (m, 2H, H25), 1.20 (m, 8H, H21-24).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): 166.3 (1C, C9), 156.6 (1C, C2), 151.8 (1C, C10), 148.8 (1C, C5), 135.8 (1C, C6), 128.4 (2C, C11, C15), 122.7 (1C, C4), 121.6 (1C, C13), 115.4 (1C, C3), 111.7 (2C, C12, C14), 105.1 (1C, C7), 68.6 (1C, C18), 40.2 (2C, C16, C17), 33.9 (1C, C27), 29.6 (1C, C26), 29.5 (1C, C21), 29.5 (1C, C19), 29.4 (1C, C24), 29.3 (1C, C23), 27.0 (1C, C25), 26.1 (1C, C20).

HRMS: calc. for C₂₅H₃₅N₃OS [M+H]⁺ =426.2574, found [M+H]⁺ =426.2568.

Compound 15: 2-chloro-N-(10-((2-(4-(dimethylamino)phenyl)benzo[d]thiazol-6-yl)oxy)docyl)acetamide:



Chemical Formula: C₂₇H₃₆ClN₃O₂S

Molecular Weight: 502,11

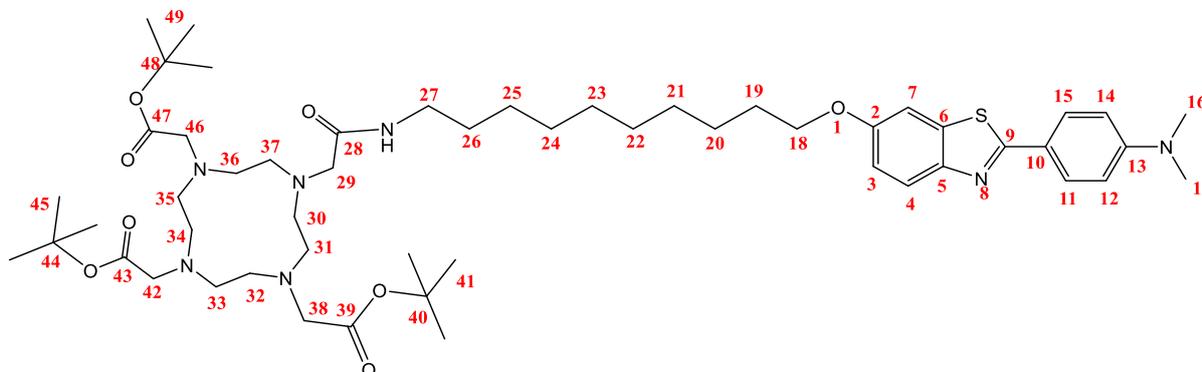
To a solution of compound **14** (500mg, 1.17mmol) and triethylamine (565μl, 4.06mmol) in 15ml of dry THF at 0°C, was added dropwise a solution of chloroacetyl chloride (650μl, 4.06mmol) in 5 ml of dry THF. The mixture was stirred 3h and 60 ml of water was added. The solution was stored at 4°C overnight. Yellowish crystals were filtered off to give 499mg (85%) of compound **15**.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): 7.90 (d, ³J= 8.9Hz, 1H, H4), 7.86 (d, ³J= 8.9Hz, 1H, H11, H15), 7.30 (d, ⁴J= 2.5Hz, 1H, H7), 7.02 (dd, ³J= 8.9Hz, ⁴J= 2.5Hz, 1H, H3), 6.74 (d, ³J= 8.9Hz, 2H, H12, H14), 6.56 (bs, 1H, NHCO), 4.01 (t, ³J= 6.5Hz, 2H, H18), 4.05 (s, 2H, H29), 3.30 (m, 2H, H27), 3.04 (s, 6H, H16, H17), 1.81 (m, 2H, H19), 1.54 (m, 2H, H26), 1.48 (m, 2H, H20), 1.36 (m, 4H, H25), 1.31 (m, 8H, H21-24).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): 166.5 (1C, C9), 165.9 (1C, C28), 156.8 (1C, C2), 152.1 (1C, C10), 148.9 (1C, C5), 135.9 (1C, C6), 128.7 (2C, C11, C15), 122.8 (1C, C4), 121.8 (1C, C13), 115.6 (1C, C3), 111.9 (2C, C12, C14), 105.3 (1C, C7), 68.6 (1C, C18), 42.9 (1C, C29), 40.4 (2C, C16, C17), 40.1 (1C, C27), 29.6 (1C, C21), 29.6 (1C, C19), 29.5 (1C, C24), 29.5 (1C, C26), 29.4 (1C, C22), 27.0 (1C, C25), 26.2 (1C, C20).

HRMS: calc. for C₂₇H₃₆ClN₃O₂S [M+H]⁺ =502.2290, found [M+H]⁺ =502.2291.

Compound 16: tert-butyl 2-[4,7-bis(2-tert-butoxy-2-oxo-ethyl)-10-[2-[10-[[2-[4-(dimethylamino)phenyl]-1,3-benzothiazol-6-yl]oxy]decylamino]-2-oxo-ethyl]-1,4,7,10-tetrazacyclododec-1-yl]acetate



Chemical Formula: C₅₃H₈₅N₇O₈S
Molecular Weight: 980,36

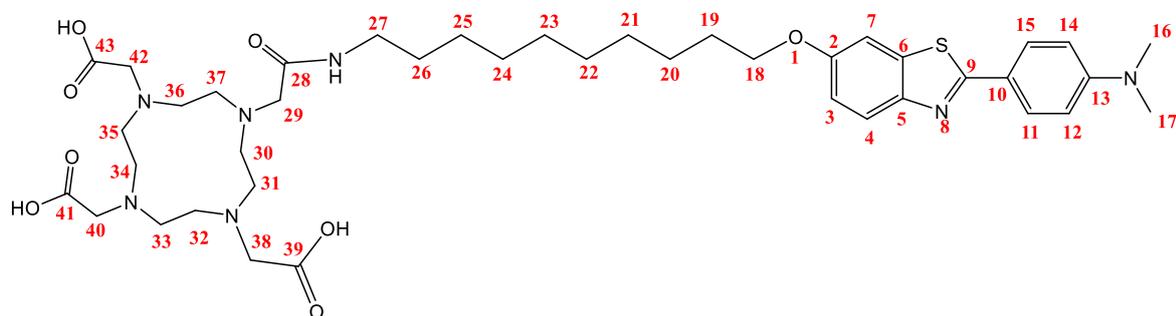
To a solution of DO3A-*t*Bu (300mg, 0.58mmol) in 20 mL of dry acetonitrile was added potassium carbonate (226 mg, 2 mmol) and a solution of **15** (310mg, 0.7 mmol) in 15 mL of dry acetonitrile. The reaction mixture was stirred for 16 h at 90°C. After cooling, the solid was filtered off and the solvent was evaporated. The crude product was purified by flash chromatography (eluent: ethyl acetate/methanol 95/5) and 407mg (72%) of product **16** were isolated as a yellow oil.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): 7.78 (d, ³J= 8.9Hz, 2H, H11, H15). 7.72 (d, ³J= 8.9Hz, 1H, H4), 7.27 (bs, 1H, NHCO), 7.20 (d, ⁴J= 2.5Hz, 1H, H7), 6.90 (dd, ³J= 8.9Hz, ⁴J= 2.5Hz, 1H, H3), 6.61(d, ³J= 8.9Hz, 2H, H12, H14), 3.89 (t, ³J= 6.4Hz, 2H, H18), 3.18 (bs, 6H, H29, H38, H46), 3.07 (m, 2H, H42), 2.93 (s, 6H, H16, H17), 2.72 (bs, 4H, H31, H36), 2.37 (bs, 4H, H33, H34), 2.08 (bs, 8H, H31, H32, H35, H37), 1.81 (m, 2H, H19), 1.69 (m, 2H, H26), 1.34 (s, 9H, H45), 1.33 (s, 18H, H41, H49), 1.23 (m, 4H, H23, H22), 1.16 (m, 8H, H20, H21, H24, H25).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): 172.4 (1C, C43), 172.0 (2C, C39, C47), 171.0 (1C, C28), 166.2 (1C, C9), 156.5 (1C, C2), 151.8(1C, C10), 148.5 (1C, C5), 135.5 (1C, C6), 128.3 (2C, C11, C15), 122.4 (1C, C4), 121.2 (1C, C13), 115.3 (1C, C3), 111.6 (2C, C12, C14), 105.0 (1C, C7), 81.5 (2C, C40, C48), 81.6 (1C, C44), 68.5 (1C, C18), 56.3 (2C, C29), 55.5 (1C, C42), 55.4 (2C, C38, C46), 52.2 (bs, 4C, C30, C33, C34, C37), 40.1 (2C, C16, C17), 39.2 (1C, C27), 29.5 (1C, C21), 29.4 (1C, C19), 29.4 (1C, C24), 29.2 (1C, C26), 29.1 (1C, C23), 27.9 (2C, C41, C49), 27.8 (1C, C45), 26.9 (1C, C25), 25.9 (1C, C20).

HRMS: calc. for C₅₃H₈₅N₇O₈S [M+H]⁺ =980.6253, found [M+H]⁺ =980.6260, [M+Na]⁺ =1002.6081.

Compound 17 : 2-[4,7-bis(carboxymethyl)-10-[2-[10-[[2-[4-(dimethylamino)phenyl]-1,3-benzothiazol-6-yl]oxy]decylamino]-2-oxo-ethyl]-1,4,7,10-tetrazacyclododec-1-yl]acetic acid (L3)



Chemical Formula: C₄₁H₆₁N₇O₈S

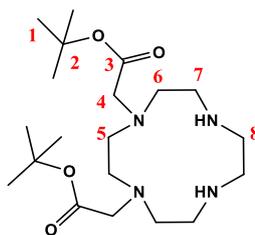
Molecular Weight: 812,04

To a solution of compound **16** (350mg, 0.38mmol) in 10ml of 1,4-dioxane was added 10ml of hydrochloric acid 4N. The solution was stirred 3h at room temperature and the solvents were evaporated. The crude product was purified by flash chromatography on RPC18 silica (H₂O/Methanol). 207mg (67%) of compound **17** were isolated as a yellow powder.

¹H NMR (600 MHz, D₂O): 7.44 (bs, 3H, H7, H11, H15), 6.56 (dd, ³J= 8.9Hz, ⁴J= 2.5Hz, 2H, H3, H4), 6.26(d, ³J= 8.9Hz, 2H, H12, H14), 2.739-3.154 (bs, 27H, H16, H17, H29, H31, H32, H35-38, H40, H42), 2.153 (bs, 6H, H27, H33, H34), 1.266 (m, 6H, H19, H26, H31), 0.982 (m, 12H, H20-25).

HRMS: calc. for C₄₁H₆₁N₇O₈S [M+H]⁺ =812.4375, found [M+H]⁺ =812.4458, [M+Na]⁺ =834.4200.

Compound 18: Di-tert-butyl 2,2'-(1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4-diyl)diacetate



Chemical Formula: $C_{20}H_{40}N_4O_4$
Molecular Weight: 400,5640

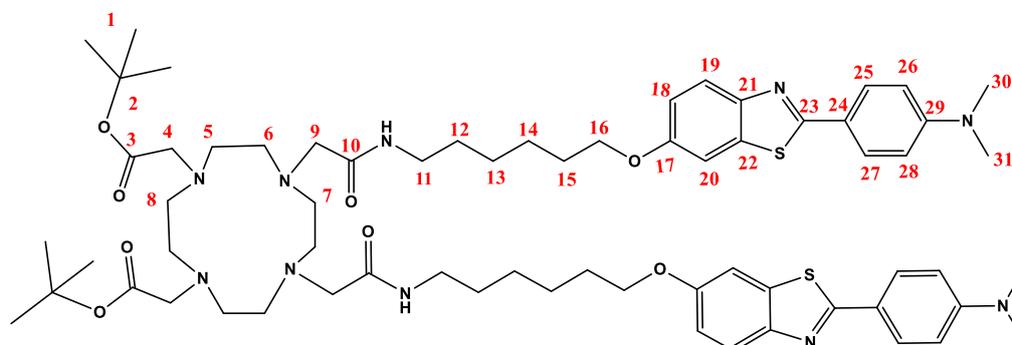
To a solution of 0,400 g (2,3 mmol) of cyclen in 20 ml of chloroform with 2,3 g (23,2 mmol) triethylamine, was added dropwise a solution of 0,905 g (4.60mmol) *tert*-butyl bromoacetate in 10 ml of chloroform over an hour. After completion of the reaction, the solvent was evaporated. To the residue, 10mL of $NaHCO_3$ was added and the product was extracted 3 times by $CHCl_3$. The organic phase was collected and dried over $MgSO_4$, then evaporated. The crude product was purified by flash chromatography in ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1). The solution was evaporated to dryness to give 0,645 g of pure, orange, oily product (70%).

1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 3.35 (s, 4H, H4), 3.01-2.99 (m, 8H, H7, H8), 2.91-2.90 (m, 8H, H5, H6), 1.45 (s, 18H, H1)

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 170.2 (2C, C3), 81.7 (2C, C4), 51.1 (2C, C5), 49.9 (2C, C6), 46.6 (2C, C7), 46.2(2C, C8), 28.2 (2C, C1).

HRMS: calc. for $C_{20}H_{40}N_4O_4$ $[M+H]^+ = 401.3132$, found $[M+H]^+ = 401.3123$, $[M+Na]^+ = 423.2942$.

Compound 19: Di-tert-butyl 2,2'-(7,10-bis(2-((6-((2-(4-(dimethylamino)phenyl)benzo[d]thiazol-6-yl)oxy)hexyl)amino)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4-diyl)diacetate



Chemical Formula: $C_{66}H_{94}N_{10}O_8S_2$
Molecular Weight: 1219,6600

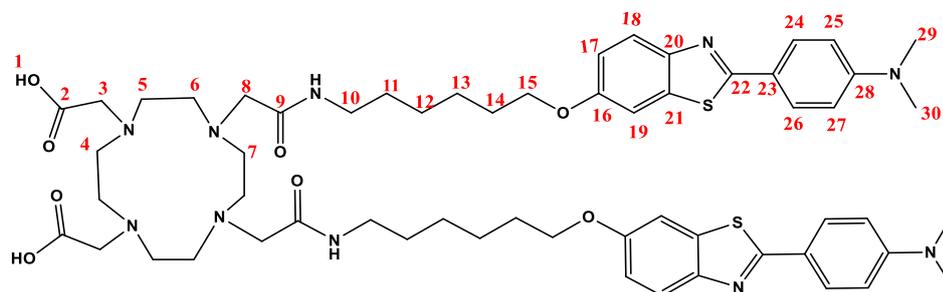
To a solution of 0.080 g (0.199 mmol) of compound **18** in 5mL of dry acetonitrile, 0.4g of K_2CO_3 was added. After 10 minutes, 0.250 g (56 mmol) of compound **9** dissolved in 5 mL of dry acetonitrile was poured. The reaction was heated in reflux overnight, the mixture was filtrated, and the solvent was evaporated. The product was purified by flash CH_2Cl_2 /EtOAc/MeOH. 0.050 g (21%) of compound **19** were isolated after cristallisation in EtOAc as a pale yellow powder.

1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) : 7.80 (d, $^3J = 8.9$ Hz, 4H, H25, H27) , 7.74 -7.19 (dd, $^3J = 8.7$ Hz, $^4J = 2.1$ Hz, 4H, H19, H20) , 7.34 (bs,1H, NHCO), 6.91 (dd, $^3J = 8.9$ Hz, $^4J = 2.1$ Hz, 2H, H18) , 6.63 (d, $^3J = 8.9$ Hz, 4H, H26, H28), 3.88 (t, $^3J = 6.5$ Hz, 4H, H16) , 3.21-3.08 (m, 8H, H4, H9), 2.96 (s, 12H, H30, H31), 2.66-2.16 (s, 16H, H5-8), 1.70 (m, 4H, H15), 1.50 (m, 4H, H12), 1.38-1.31 (s, 26 , H13, H14, H1).

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 171.1 (2C, C10), 170.2 (2C, C3), 166.4 (2C, C23), 156.6 (2C, C17), 151.9 (2C, C24), 148.8 (2C, C21), 135.8 (2C, C22), 128.5 (4C, C25, C27), 122.6 (2C, C19), 121.6 (2C, C29), 115.4 (2C, C18), 111.7 (2C, C26, C28), 105.0 (2C, C20), 81.9 (2C, C2), 68.5 (2C, C16), 60.4 (2C, C9), 55.8 (2C, C4), 52.9 (4C, C5, C6), 40.2 (4C, C30, C31), 39.4 (2C, C11), 29.5 (2C, C15), 29.2 (2C, C12), 28.1 (2C, C1), 26.8 (2C, C13), 25.8 (2C, C14).

HRMS: calc. for $C_{66}H_{94}N_{10}O_8S_2$ $[M+H]^+ = 1219.6771$, found $[M+H]^+ = 1219.6767$, $[M+Na]^+ = 1241.6587$.

Compound 20: 7,10-bis(2-((6-((2-(4-(dimethylamino)phenyl)benzo[d]thiazol-6-yl)oxy)hexyl)amino)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4-diyl)diacetate (Lcis)



Chemical Formula: $C_{58}H_{78}N_{10}O_8S_2$
Molecular Weight: 1107,4440

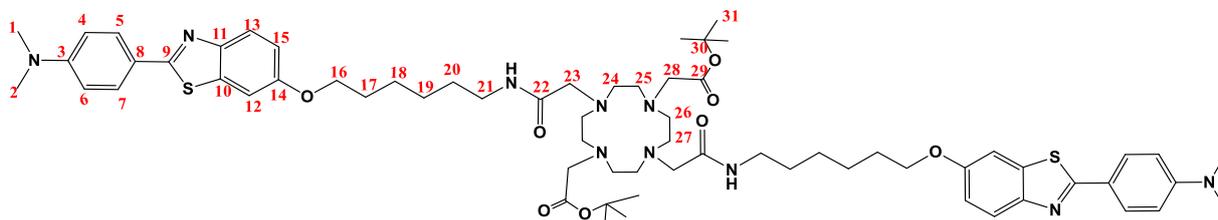
To a solution of compound **19** 0.050 g (0.041 mmol) in 5mL of dioxane and 5mL of HCl solution 4M. The mixture was stirred for 1hour, then the solvent was evaporated. 0.040 g (80%) of compound **20** were isolated as yellow oily product.

1H NMR (600 MHz, D_2O): 7.83 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 4H, H24, H26), 7.78 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 2H, H118), 7.23 (d, $^4J = 2.5$ Hz, 2H, H19), 6.94 (dd, $^3J = 8.9$ Hz, $^4J = 2.7$ Hz, 2H, H17), 6.66 (d, $^3J = 9.1$ Hz, 4H, H25, H27), 6.53 (bs, 2H, NHCO), 3.94 (t, $^3J = 6.5$ Hz, 4H, H15), 3.26 (m, 8H, H3, H8), 2.96 (s, 12H, H29, H30), 2.66-2.16 (s, 16H, H4-7), 1.70 (m, 4H, H14), 1.50 (m, 4H, H11), 1.38-1.31 (s, 8H, H12, H13).

^{13}C NMR (150 MHz, D_2O): δ (ppm) 171.1 (2C, C9), 170.3 (2C, C2), 166.4 (2C, C22), 156.6 (2C, C16), 151.9 (2C, C23), 148.8 (2C, C20), 135.8 (2C, C21), 128.5 (4C, C24, C26), 122.6 (2C, C18), 121.6 (2C, C28), 115.4 (2C, C17), 111.7 (4C, C25, C27), 105.0 (2C, C19), 68.5 (2C, C15), 60.4 (2C, C8), 55.8 (2C, C3), 52.9 (4C, C5, C6), 40.2 (4C, C29, C30), 39.4 (2C, C10), 29.5 (2C, C14), 29.2 (2C, C11), 26.8 (2C, C12), 25.8 (2C, C13).

HRMS: calc. for $C_{58}H_{78}N_{10}O_8S_2$ $[M+H]^+ = 1106.5446$, found $[M+H]^+ = 1106.5650$, $[M+Ca]^{2+} = 1144.5040$.

Compound 21: tert-butyl 2-[7-(2-tert-butoxy-2-oxo-ethyl)-4,10-bis[2-[6-[[2-[4-(dimethylamino)phenyl]-1,3-benzothiazol-6-yl]oxy]hexylamino]-2-oxo-ethyl]-1,4,7,10-tetrazacyclododec-1-yl]acetate



Chemical Formula: $C_{66}H_{94}N_{10}O_8S_2$
Molecular Weight: 1219,6600

Same procedure as **compound 11**, starting from **10**. Yield 47%.

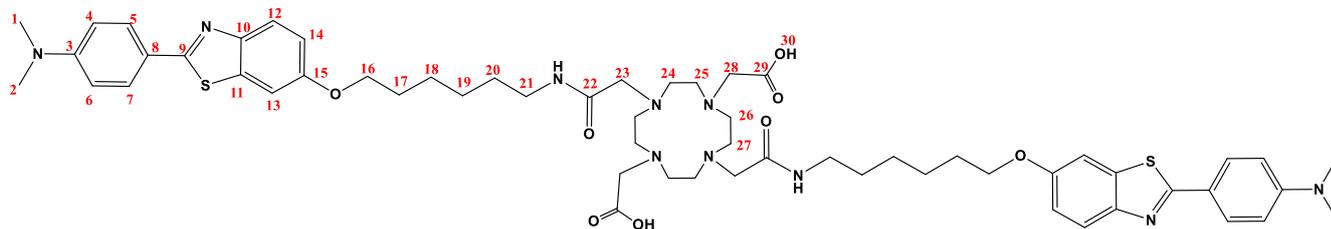
Reagents: DO2A-*t*Bu, Compound **10**, ACN, K_2CO_3 .

1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) : 7.99 (bs, 1H, NHCO), 7.82 (d, $^3J = 8.9$ Hz, 2H, H13), 7.77 (d, $^3J = 8.9$ Hz, 4H, H5, H7), 7.21 (d, $^4J = 2.5$ Hz, 2H, H12), 6.94 (dd, $^3J = 8.9$ Hz, $^4J = 2.52$ Hz, 2H, H15), 6.66 (d, $^3J = 8.9$ Hz, 4H, H4, H6), 3.92 (t, $^3J = 6.5$ Hz, 4H, H16), 3.20 (q, $^3J = 8.9$ Hz, 4H, H21), 3.12 (s, 4H, H23), 2.97 (s, 12H, H1, H2), 2.74-2.50 (bs, 8H, H24-H27), 1.49-1.45 (bs, 4H, H20), 1.45 (bs, 4H, H21), 1.37 (s, 26H, H18, H19, H31).

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 170.8 (2C, C22), 166.4 (2C, C9), 165.6 (2C, C14), 151.9 (2C, C8), 148.9 (2C, C11), 135.8 (2C, C10), 128.5 (4C, C5, C7), 122.8 (2C, C13), 121.9 (2C, C3), 115.3 (2C, C15), 111.8 (2C, C4), 105.0 (2C, C12), 81.4 (2C, C30), 68.4 (2C, C16), 59.3 (2C, C23), 56.2 (2C, C28), 52.9 (4C, C24, C25), 40.2 (4C, C1, C2), 39.1 (2C, C21), 29.8 (2C, C17), 29.3 (2C, C20), 28.2 (2C, C31), 26.9 (2C, C19), 25.88 (2C, C18).

HRMS: calc. for $C_{66}H_{94}N_{10}O_8S_2$ $[M+H]^+ = 1219.6771$, found $[M+H]^+ = 1219.6767$.

Compound 22: 2-[7-(carboxymethyl)-4,10-bis[2-[6-[[2-[4-(dimethylamino)phenyl]-1,3-benzothiazol-6-yl]oxy]hexylamino]-2-oxo-ethyl]-1,4,7,10-tetrazacyclododec-1-yl]acetic acid (Ltrans)



Chemical Formula: C₅₈H₇₈N₁₀O₈S₂
Molecular Weight: 1107,4440

Same procedure as **compound 12**. Yield: 80%.

¹³C NMR (150 MHz, D₂O): δ(ppm) 171.7 (2C, C29), 171.3 (2C, C22), 166.4 (2C, C9), 156.6 (2C, C15), 151.9 (2C, C8), 148.7 (2C, C10), 135.8 (2C, C11), 128.5 (4C, C5, C7), 122.6 (2C, C12), 121.6 (2C, C3), 115.4 (2C, C14), 111.8 (4C, C4, C6), 105.0 (2C, C13), 68.5 (2C, C16), 60.4 (2C, C28), 56.5 (2C, C23), 55.5 (4C, C24, C25), 40.2 (4C, C1, C2), 39.4 (2C, C21), 29.7 (2C, C17), 29.2 (2C, C20), 26.7 (2C, C19), 25.8 (2C, C18).

HRMS: calc. for C₅₈H₇₈N₁₀O₈S₂ [M+H]⁺ = 10107.5519, found [M+H]⁺ = 1107.5510.

1.3 Methods of characterization and analysis

i. Mass spectrometry

High Resolution Mass Spectrometry (HRMS) spectra were recorded on a Bruker maXis mass spectrometer at the Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA) as part of the Research Federation (FR 2708) with the Centre de Biophysique Moléculaire (CBM) in Orléans. This technique is based on using an electron spray ionization (ESI).

ii. Complex preparation

Gd(III) solutions were prepared from GdCl₃ in MilliQ water and the concentration was determined by complexometric titration with normalized EDTA in urotropine buffer (pH 5.6-5.8). The purity of the ligands was assessed by adding an excess of Zn(II) to the ligand solution, followed by complexometric titration of the non-complexed Zn(II) with EDTA.

In order to prepare the GdL_x complexes, stoichiometric amounts of the GdCl₃ solution were added to each ligand solution and the pH was continuously adjusted to 5.5. The absence of free Gd(III) was checked by the xylene orange test. The concentration of Gd(III)-containing solutions was also checked both by ICP-MS (Inductively Coupled Plasma) and BMS (Bulk Magnetic Susceptibility) measurements when possible (Gd(III) concentrations at least in the millimolar range for BMS).

iii. Log P determination

The « shake flask »⁵ technique was used for our experiments. Octanol and water, respectively saturated with the other solvent, were used. The quantification of the concentration was done with UV-vis spectrophotometry (using the absorption of the benzothiazol ring at 330nm wavelength) and ICP-OES in the case of GdL_{cis} and GdL_{trans}.

In 2mL eppendorf tubes, 0.5mL of water saturated with octanol and another 0.5mL of octanol saturated with water were added to a weighed amount of GdL_x. For GdL₁, GdL₂ and GdL₃, we determined the concentrations in each phase after 30 min centrifugation in Quartz cells. For GdL_{cis} and GdL_{trans}, due to low solubility, we left the mixture on automatic stirring overnight, then we determined the concentration in each phase with ICP-OES and UV-vis.

iv. DLS

Dynamic light scattering measurements were performed on a Zetasizer Nano Series ZS (Malvern) instrument with temperature control. Each sample was recorded at 37 ± 1 °C, in

⁵ Albert Leo, Corwin Hansch, et David Elkins, « Partition coefficients and their uses », *Chemical Reviews* 71, n° 6 (1 décembre 1971): 525- 616, <https://doi.org/10.1021/cr60274a001>.

quintuple, each measurement is the average of 20 data sets acquired for 10 s each. Hydrodynamic diameters have been calculated using the internal software analysis from the DLS intensity-weighted particle size distribution.

v. UV-visible spectroscopy

For CMC determination, UV-visible absorption spectra were recorded on a PerkinElmer Lambda 19 spectrometer in the region $\lambda=195-700$ nm at 25 °C. The samples were studied in 1 cm and 3mm quartz cells.

A series of dilution from concentrated solution of complexes gave UV-vis spectra as a function of concentration. CMC values correspond to the intersection of two curves of λ_{\max} in function of the concentration with two different slopes.

vi. Fluorescence studies

Fluorescence spectra were recorded on an Agilent Cary Eclipse Fluorescence spectrophotometer.

Emission spectra were collected in the range of $\lambda = 350 - 500$ nm at 310.15 K, following the excitation of the PiB derivative moiety at 330 nm using PMT Detector voltage High. The samples were contained in 1 cm quartz cells. Solutions of **GdL1-3**, **GdLtrans** and **GdLcis** were prepared in water for CMC determination.

A series of dilution from concentrated solutions of complexes were used to record emission spectra. Plots of emission intensity as a function of the concentration at a given λ gave curves with intersection due to a change in the slope corresponding to a CMC value.

vii. Surface plasmon resonance spectroscopy:

A Biacore 3000 instrument (Biacore Life Science/GE Healthcare Uppsala, Sweden) was used for real time studies to assess the binding of the Ln(III) complexes to immobilized peptides by SPR spectroscopy. The immobilization was done on CM5 sensorchips. N-hydroxysuccinimide (NHS) and N-ethyl-N'-[(dimethylamino)propyl]-carbodiimide (EDC) were used for the activation of carboxylate functions. Etanolamine, HCl, vials for samples and caps were purchased from GE/Healthcare. HBS-EP (pH7.4) which is composed of HEPES (0.01 molL^{-1}), NaCl (0.15 molL^{-1}), EDTA (3 mmolL^{-1}) and P20 surfactant (0.0005%) was used as the running buffer.

$\text{A}\beta_{1-40}$ and amylin were dissolved in acetate buffer at pH 5 (0.2mg of peptide in 500 μL) and left at 37°C overnight to form enough aggregates. The immobilization followed standard

amine coupling conditions. Activation of the carboxymethyl dextran matrix on the CM5 chips was realized with the injection, during 420s, of 70 μ L of the mixture EDC/NHS (200 μ L of 0.05M NHS and 50 μ L of 0.2M EDC).

After sonication, 50 μ L of the peptide solution was injected into the activated flow cell with a flow of 10 μ L /min with 300s of contact time. Unreacted NHS ester is used to grab the peptide to the activated carboxylate groups for the amine coupling reaction. The second step of the immobilization is the elongation phase, consisting of injecting ten times a volume of 400 μ L of the monomeric peptide with a flow rate of 20 μ L /min leading to a contact time of 1200s.

The unreacted NHS esters were capped with 70 μ L ethanolamine to result in a surface with a final change in resonance units (RU) equal to 9126.4RU. Knowing that 1.0 pgmm⁻² of bound ligand results in 1000RU, it means that the total immobilized mass of A β ₁₋₄₀ is 9.1264 pg.mm². The same immobilization state was obtained with amyline. For HSA a value of 11000RU was obtained (immobilization level equal to 11pg.mm⁻²). Chips with immobilization level of 4000RU were also prepared with A β ₁₋₄₀ and amyline and gave comparable results to those obtained with a higher immobilization level (Chapitre III).

Furthermore, to test the affinity of the metal complexes, we need to maximize the contact time so we decided to keep the flow rate in all steps at 30 μ L /min. GdL1, GdL2 and GdL3 solutions were prepared at a concentration of 500 μ M with the running buffer. 150 μ L of these solutions was injected with an association and dissociation time equal to 300s each. This procedure was repeated for every complex and every concentration studied. For the regeneration of the surface, a solution of 10mM glycine–NaOH in 10mM Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane) buffer at pH9 was used with a contact time of 18s and a flow rate of 100 μ L /min. Then we reduce the flow rate to 30 μ L/min, re-inject the regeneration solution if necessary and wash the flow cell with the running buffer for 5min before the next injection.

The injection system was checked with every new chip, and primed in case of using a different buffer. Biacore 3000 control software (version 4.1) was used to record and analyze the time dependence of the RUs and to plot the binding curves. The response at equilibrium was plotted versus concentrations. The Langmuir binding isotherm was used to fit the binding plots and obtain the dissociation constant (K_D). The software GraphPad was used to fit the binding plots and determine K_D .

viii. Circular Dichroism:

A Jasco-810 CD spectropolarimeter equipped with a Jasco PTC 6423S temperature control unit was used to acquire the far UV-CD spectra. Spectra were recorded at 37°C at 170-260nm with a step size of 0.5 and a bandwidth of 1nm (1 mm optical path-length). Data were collected with a time of 0.5s per point, spectra were averaged over 10 scans and the buffer contributions were corrected. The samples contained A β ₁₋₄₀ (40 μ M) in water and peptide:GdL1-3 molar ratios of 1:0.1, 1:1, 1:2, 1:4 and for amyline(15 μ M), the ratios are as follow (1:0.1, 1:1, 1:2, 1:4). A 1:10 ratio have been tested with A β ₁₋₄₀(25 μ M) and both complexes GdL1 (250 μ M) and GdL2 (250 μ M) . For GdL*trans* and GdL*cis*, the samples contain A β ₁₋₄₀(15 μ M) or amyline(15 μ M) in water, peptide:GdL*trans/cis* ratios are (1:0.1, 1.05, 1:1). Between the measurements, the samples were incubated in a Cole-Parmer Eppendorf Heater at 37°C.

ix. ¹H NMRD measurements

Proton NMRD measurements were performed on a Stelar SMARTracer Fast Field Cycling relaxometer (0.01-10 MHz) and a Bruker WP80 NMR electromagnet adapted to variable field measurements (20-80 MHz) and controlled by a SMARTracer PC-NMR console. The temperature was monitored by a VTC91 temperature control unit and maintained by a gas flow. Samples were prepared in HEPES (pH=7.4) at the following concentrations: [GdL2]=[A β ₁₋₄₀]=0.2mM and [HSA]=0.6mM+[GdL2]=0.2mM, [GdL3]=[A β ₁₋₄₀]=0.22mM , [HSA]=0.6mM+[GdL3]=0.49mM, at 25°C and 37°C.

1.4 In-vivo Studies

i. Synthesis of ¹¹¹In complexes

¹¹¹InCl₃ was purchased from Mallinckrodt/Curiumpharma (Le Petten, Netherlands). The pH of 150 μ L aliquots of ¹¹¹InCl₃ (112 - 130 MBq) were adjusted to pH 7 by addition of a freshly prepared NaOH solution. Radiolabelling of the ligands L2 and L3 was performed as follows: a) 1 μ L of a 1.54 mM solution of L2 was mixed with 150 μ L of ¹¹¹InCl₃ (133 MBq) giving a 13 μ M final concentration, b) 50 μ L of an aqueous 1.29 mM solution of L3 was mixed with 150 μ L of ¹¹¹InCl₃ (112 MBq) giving a 323 μ M final concentration. The pH of the mixtures is readjusted to 7 (with NaOH) and this solution stirred for 1h at 50°C. A radiochemical yield >98% was obtained and no further purification was performed. Labelling efficiency was followed by ascending silica gel ITLC (Polygram, Macherey–Nagel) developed with the

mobile phase MeOH:H₂O:NH₄OH (2:4:0.2). The TLCs are exposed by impregnation on a multisensitive phosphor screen (Packard, Perkin Elmer, Meriden, USA, and revealed on a Cyclone Storage phosphor system Packard, Perkin Elmer, Shelton, USA). In this system the ¹¹¹In-complexes migrate with R_f = 0.9, while ¹¹¹InCl₃ remains at the origin.

Prior to injection, the radiocomplex solutions were diluted with a PBS/saline buffer yielding a final concentration of 1.9 μM for L2 (26.0 MBq) and 39.5 μM for L3 (19.7 MBq).

ii. Biodistribution studies

8-weeks-old C57BL/6JRj wild type males were purchased from Janvier Labs (Le Genes Saint Isle, France). All animal experiments were carried out in accordance with the guidelines for animal experiments and under permission number 19861, from the French “Ministère de l’Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l’Innovation”.

A group of six mice per ligand (25.5±3.3 g and 27.1±2.3 g for ¹¹¹InL2 and ¹¹¹InL3 respectively) were injected intravenously (tail vein) with 2.08 ± 0.15 MBq of ¹¹¹InL2 and 3.10 ± 0.07 MBq of ¹¹¹InL3 (in 200μL) and an *ex vivo* biodistribution study was performed at 2 and 30 min post-injection.

After 2 and 30 min, mice were sacrificed by cervical dislocation and the organs of interest (pancreas, brain, kidneys, lungs, heart, liver, spleen, intestine, muscle and bone (femur)) were harvested, weighted and their activity measured using a Carpintec gamma counter as well as a NaI based γ-camera (the acquired spectra are treated with WinTMCA program). Calibration of both equipment was done by measuring a set of 9 solutions with activities between 0 and 2 MBq in both equipment, under the same conditions of the organs’ measurements (distance and time and energy range of measurement acquisition), yielding a good correlation: $y = 3.943 \times 10^6 \Sigma$, $R^2 = 0.9999$. All data was corrected for the activity decay, bringing the activity to the injection time of each animal, as well as converted to MBq (Carpintec) using the calibration curve obtained. Biodistribution data is presented as % of injected dose per weight of organ (% ID/g) ± standard deviation (n=3).

Annexe

Annexe

Annexe1 : SPR : Modèle de Langmuir

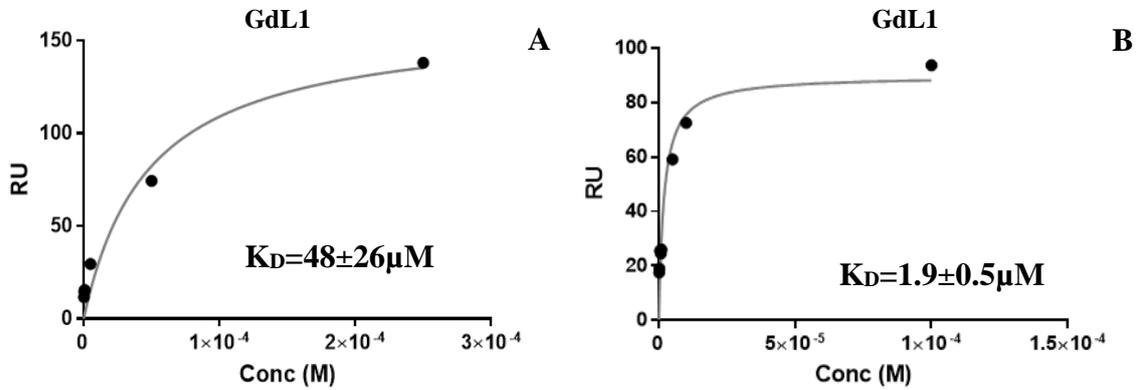


Figure III.1: Représentation de Langmuir 1:1 exprimant les interactions de GdL1 avec l'Aβ₁₋₄₀ (A), et l'amyline (B) pour un niveau d'immobilisation de 9000RU, à pH 7.4, 37°C.

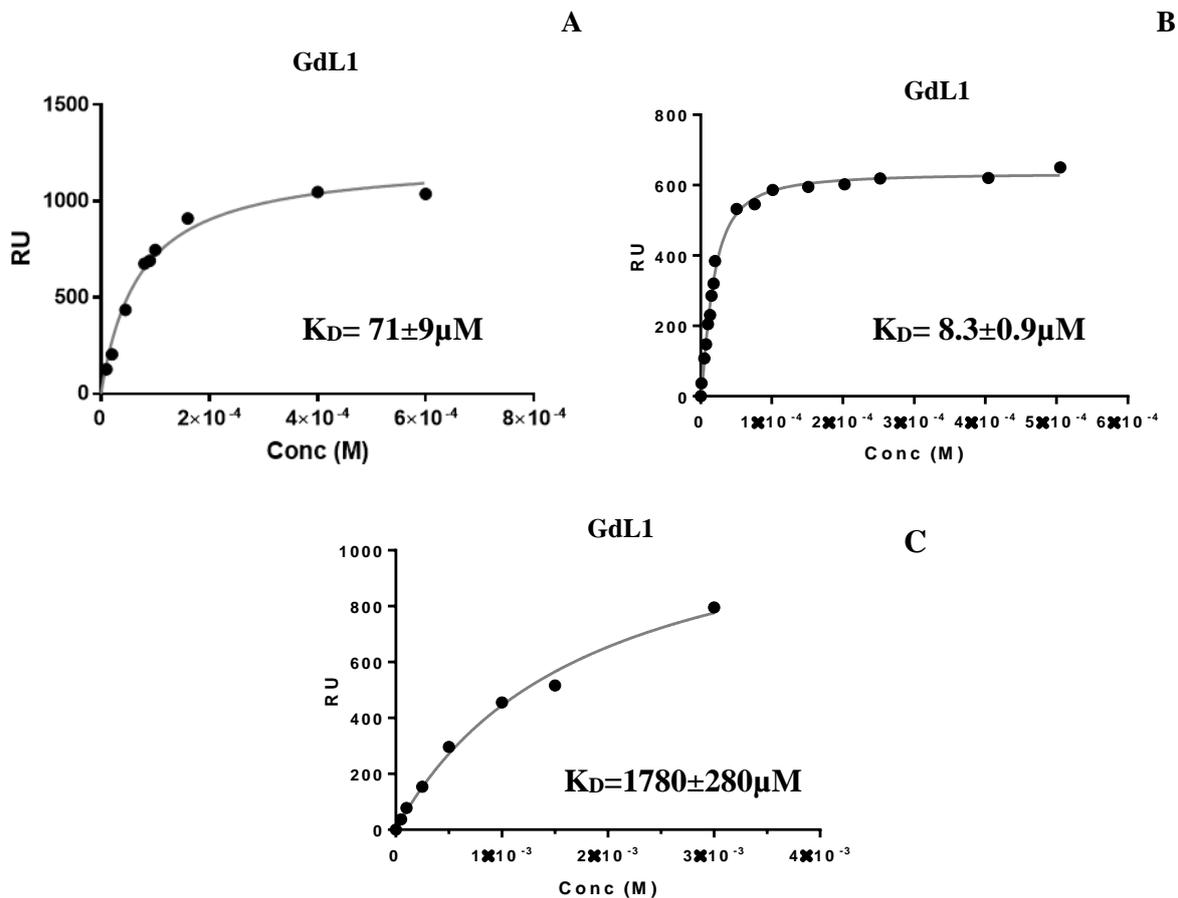


Figure III.2: Représentation de Langmuir 1:1 exprimant les interactions de GdL1 avec l'Aβ₁₋₄₀ (A), et l'amyline (B) pour un niveau d'immobilisation de 4000RU, et l'interaction avec la HSA pour un niveau d'immobilisation de 11000RU (C) à pH 7.4, 37°C.

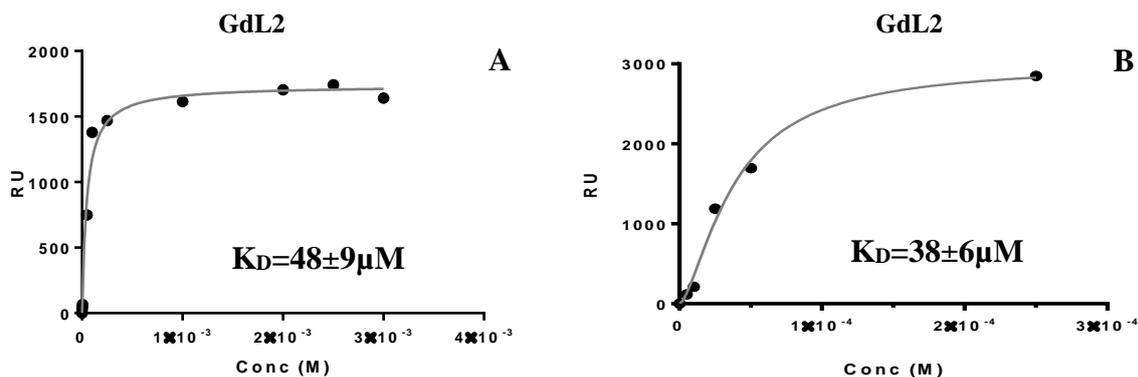
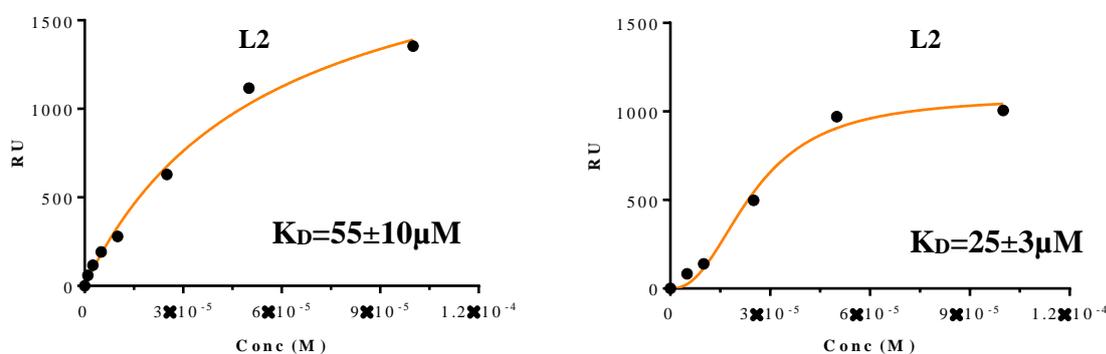


Figure III.3: Représentation de Langmuir 1:1 exprimant les interactions de GdL2 avec l'Aβ₁₋₄₀ (A), et l'amyline (B) pour un niveau d'immobilisation de 9000RU à pH 7.4, 37°C.



Figures III.4 : Représentation de Langmuir 1:1 exprimant les interactions de L2 avec l'Aβ₁₋₄₀ (A), et l'amyline (B) pour un niveau d'immobilisation de 9000RU à pH 7.4, 37°C.

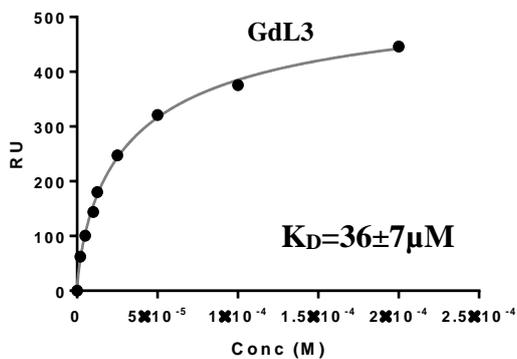


Figure III.5 : Représentation de Langmuir 1:1 exprimant les interactions de GdL3 avec HSA pour un niveau d'immobilisation de 11000RU à pH 7.4, 37°C.

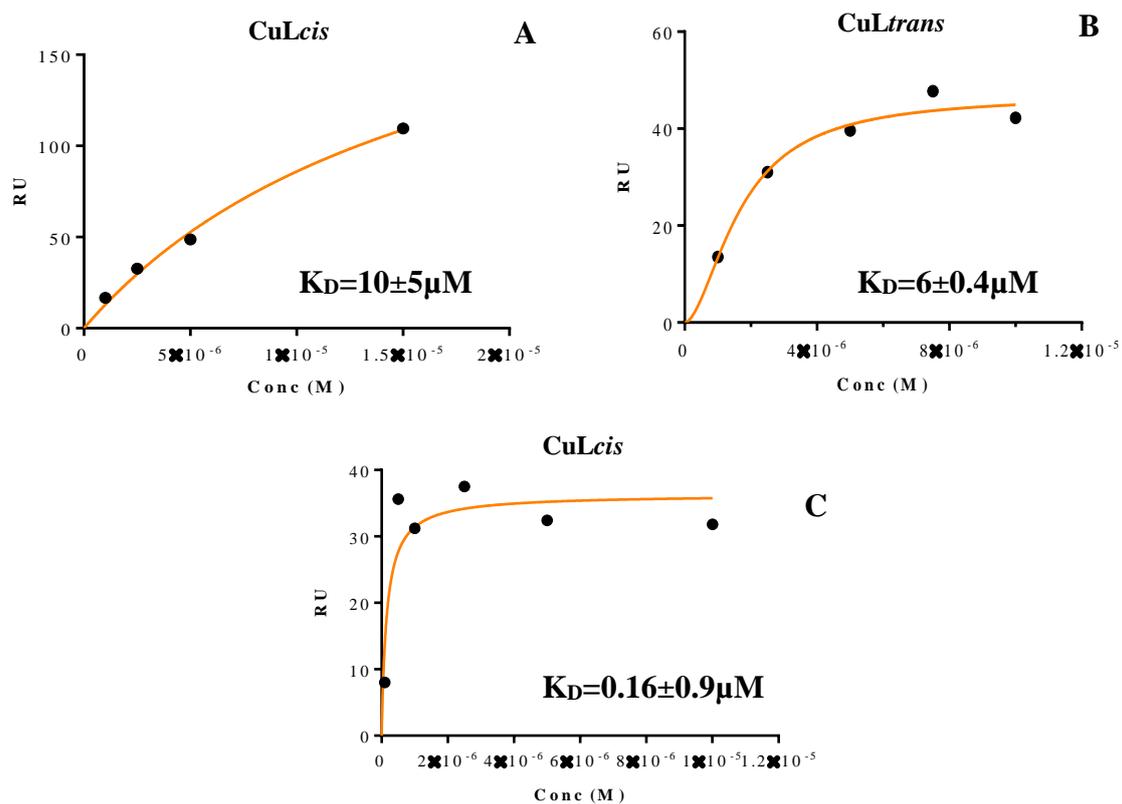


Figure IV.5 : Représentation de Langmuir 1:1 exprimant les interactions de CuLcis avec l'amyline (A), de CuLtrans avec l'amyline (B), et les interactions avec l'Aβ₁₋₄₀ de CuLcis (C), pour un niveau d'immobilisation de 9000RU à pH 7.4, 37°C.

Annexe 2 : SPR : linéarisation de Langmuir : Modèle Scatchard

Cas de l'Aβ₁₋₄₀ :

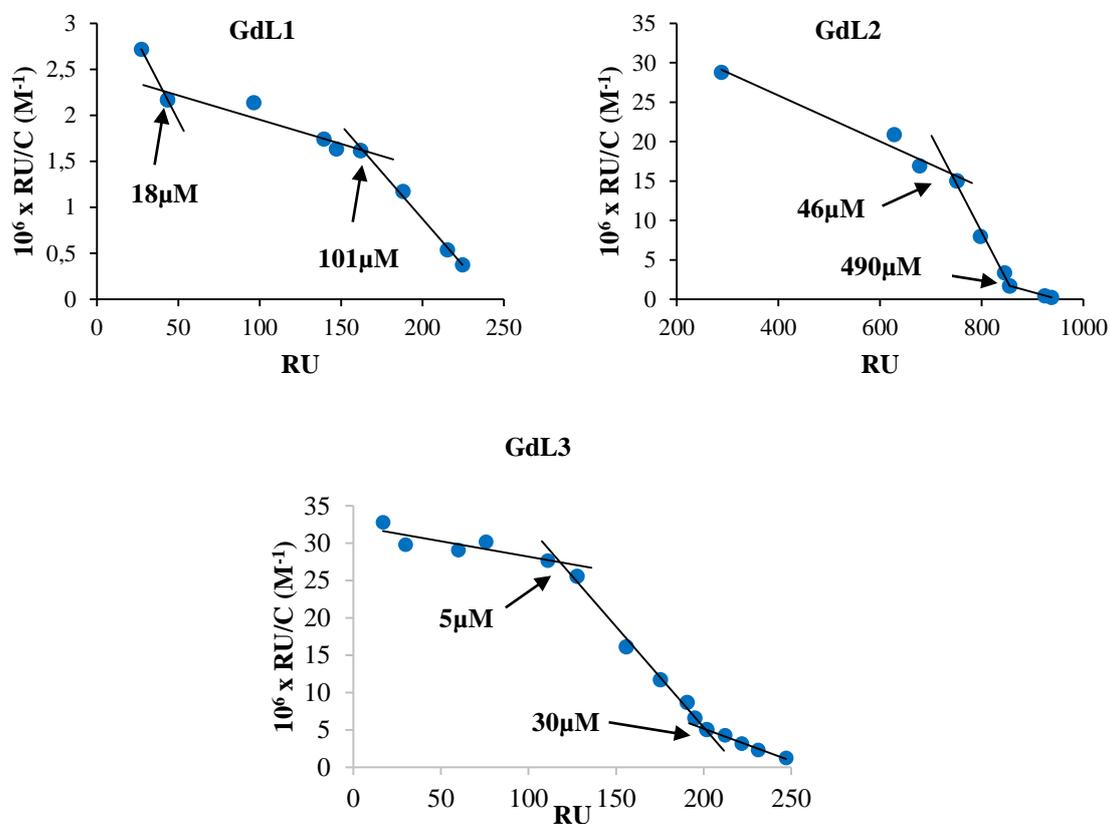


Figure III.6: Représentation Scatchard de l'interaction des complexes GdL1-3 avec l'Aβ₁₋₄₀, pour un niveau d'immobilisation de 4000RU à pH 7.4, 37°C.

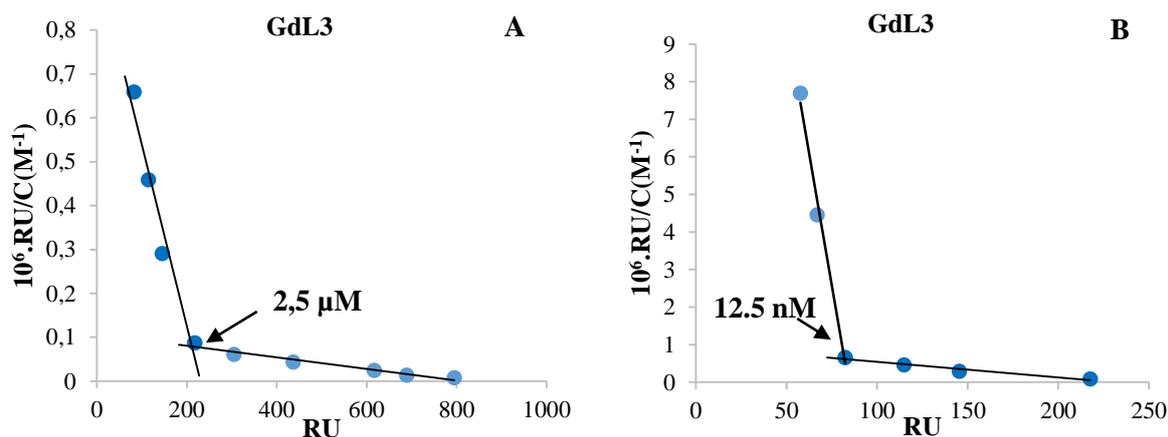


Figure III.7: Représentation Scatchard de l'interaction de GdL3 avec l'Aβ₁₋₄₀, pour une concentration du complexe de 100 μM à 1255 nM (A), et de 2.5 μM à 7.5 nM (B), pour un niveau d'immobilisation de 9000RU à pH 7.4, 37°C.

Cas de l'amyline :

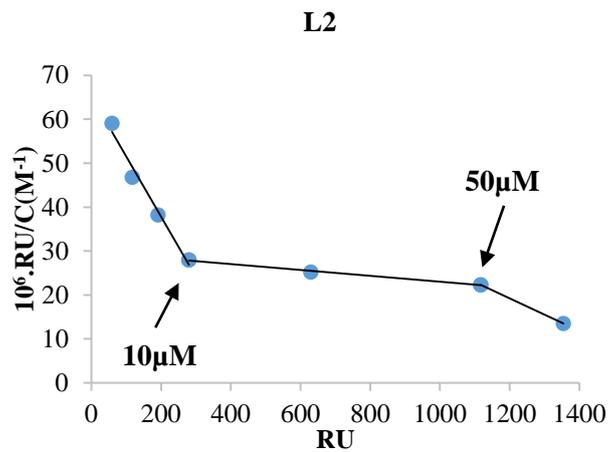


Figure III.8: Représentation Scatchard de l'interaction de L2 avec l'amyline pour un niveau d'immobilisation de 9000RU à pH 7.4, 37°C.

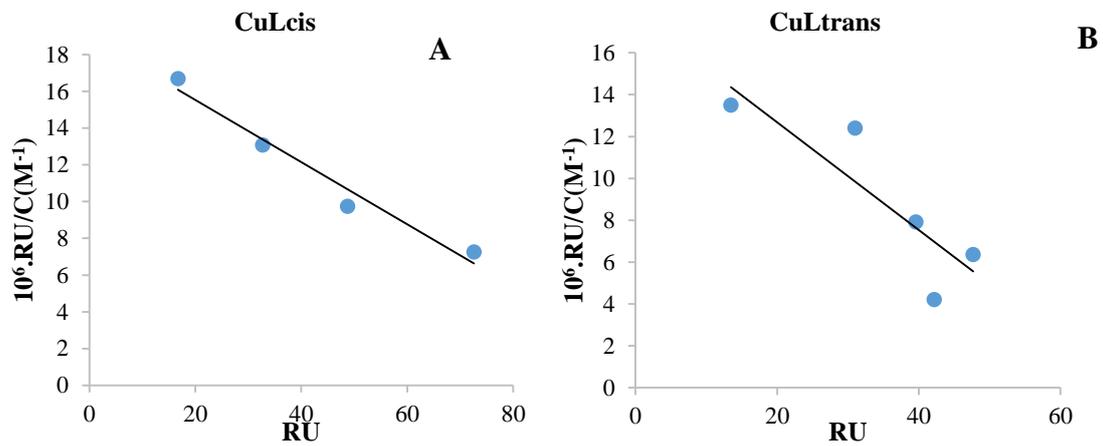


Figure IV.9: Représentation Scatchard de l'interaction des complexes de CuLcis (A) et CuLtrans (B) avec l'amyline, pour un niveau d'immobilisation de 9000RU à pH 7.4, 37°C.

Cas de la HSA :

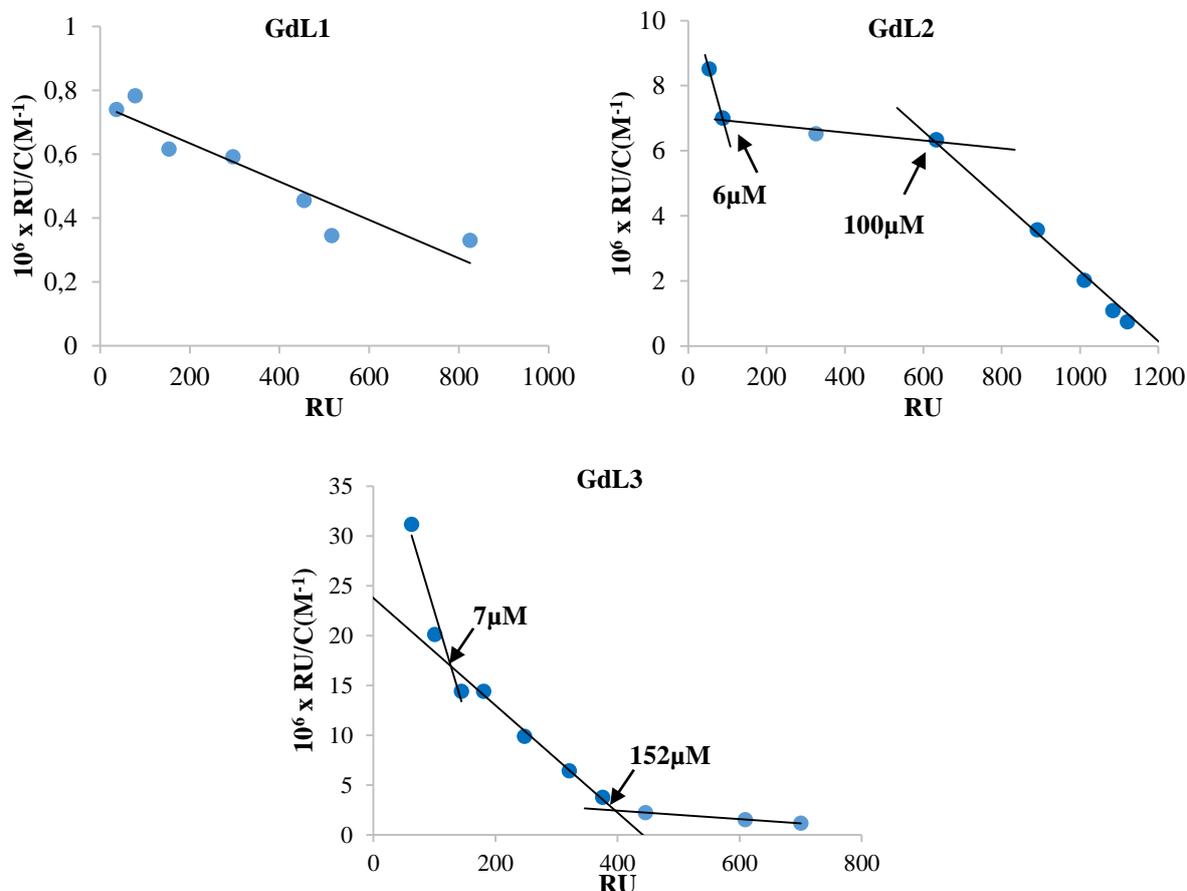


Figure III.10: Représentation Scatchard de l'interaction des complexes GdL1-3 avec la HSA, pour un niveau d'immobilisation de 11000RU à pH 7.4, 37°C.

Annexe 3 : (Chapitre III : 3.7 Etude de Biodistribution ex vivo) :

Valeurs de pourcentage de dose injectée par poids d'organe (%ID/g ± SD)

	¹¹¹ InL2		¹¹¹ InL2 ^a	¹¹¹ InL3	
	2 min	30 min	London 30 min	2 min	30 min
pancreas	2.9 ± 0.4	1.0 ± 0.3	---	3.7 ± 0.6	1.8 ± 0.2
cerveau	0.3 ± 0.1	0.14 ± 0.02	0.05 ± 0.07	0.31 ± 0.04	0.21 ± 0.01
foie	3.6 ± 0.3	2.8 ± 0.2	15.3	11.4 ± 1.3	21.7 ± 2.5
reins	17.9 ± 1.8	7.4 ± 1.5	74.9	15.1 ± 1.2	10.5 ± 1.1
poumons	8.0 ± 0.8	3.2 ± 0.2	13.2	10.7 ± 1.6	5.0 ± 2.2
cœur	5.0 ± 0.7	2.0 ± 0.5	6.6	8.4 ± 0.7	5.2 ± 0.8
intestins	2.2 ± 0.0	1.1 ± 0.1	0.3	3.0 ± 0.1	5.4 ± 0.7
os	2.3 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.1	2.0 ± 0.4	1.8 ± 0.2
rate	3.5 ± 0.2	1.8 ± 0.2	3.0	6.8 ± 0.7	6.4 ± 1.2
muscles	2.1 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.2	1.6 ± 0.2	1.5 ± 0.3

^a Ref : P. M. Costa, J. T-W. Wang, J. F. Morfin, T. Khanum, Wan To, É. Tóth and K. T. Al-Jamal, Nanotheranostics, 2018, 2, 168-183.

Saida Majdoub

Visualisation de l'amyline avec des sondes métalliques pour une imagerie du diabète

Le diabète est l'une des causes majeures de décès dans le monde ; 422 millions d'individus en souffrent dont 90% sont atteints de diabète de type II. Cette pathologie est caractérisée par la formation d'agrégats toxiques d'un peptide amyloïde : l'amyline. Durant cette dernière décennie, plusieurs sondes d'imagerie ont été développées pour la détection des peptides amyloïdes, en particulier, les agrégats $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$ dans le cas de la maladie d'Alzheimer. Ces sondes ont été principalement destinées aux techniques nucléaires (TEMP, TEP). Peu sont les sondes qui sont destinées pour l'IRM.

Cette thèse focalise sur le développement et la caractérisation de nouveaux agents de contraste pour la détection de l'amyline et de l' $A\beta_{1-40}$ au niveau du pancréas afin de comprendre les mécanismes régissant la le diabète de type II. Ces agents consistent en un complexe de gadolinium couplé à un espaceur, et une ou deux unités de ciblage contenant un dérivé de PiB (Pittsburgh compound B).

Nous avons cherché à optimiser l'affinité de nos sondes envers les agrégats de peptides amyloïdes (amyline et $A\beta_{1-40}$) en modulant principalement la longueur de l'espaceur, mais aussi en faisant varier le nombre d'unités ciblantes. Nous avons ainsi caractérisé leur lipophilie, mis en évidence les différents états d'agrégation des sondes dans ces études et l'importance de ce paramètre lors de la détermination leur affinité envers les peptides amyloïdes. Enfin nous avons étudié l'influence de nos sondes sur le processus d'agrégation des peptides amyloïdes. Nous avons grandement augmenté l'affinité par l'allongement du linker et noté une certaine sélectivité vis-à-vis de l'amyline avec deux unités ciblantes.

La biodistribution *in vivo* chez des souris saines a donné des résultats encourageants et prometteurs.

Mots clés : Amyline, $A\beta_{1-40}$, Agents de contraste, IRM, Diabète, SPR, CD, PiB, Gd(III).

Diabetes Imaging by Amylin visualizing with Metal-based Probes

Diabetes is a major cause of death in the world; 422 million people are affected of which 90% are diagnosed with type II diabetes (T2DM). This disease is characterized by the formation of toxic aggregates of the amyloid peptide named amylin. During the last decade, several imaging probes have been developed for the detection of amyloid peptides, mostly $A\beta$ aggregates ($A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$), in the context of Alzheimer's disease. These probes have been mainly developed for PET and SPECT detection. Only few probes have been developed for MRI detection of amyloid plaques.

This work focus on development and characterization of novel metal-based imaging probes for the visualization of amylin and amyloid peptide $A\beta_{1-40}$ in the pancreas in order to understand the mechanisms behind T2DM. The probes contain one or two amyloid-targeting units (derivatives of PiB = Pittsburgh compound B), a macrocyclic metal chelate as imaging reporter and a spacer between the two.

We have optimized the affinity of our probes for amyloid peptides aggregates (amylin and $A\beta_{1-40}$) mainly by modulating the length of the spacer, but also by varying the number of targeting units. We have characterized their lipophilicity, highlighted the different states of aggregation of the probes in these studies and, the importance of this parameter when determining their affinity for amyloid peptides. Finally, we studied the influence of our probes in the aggregation process of amyloid peptides. We remarkably increased the affinity by extending the linker and noted a certain selectivity towards amylin with two targeting units.

The *in vivo* biodistribution in control mice gave encouraging and promising results.

Keywords: Amylin, $A\beta_{1-40}$, Contrast agents, MRI, Diabetes, SPR, DC, PiB, Gd(III).



Centre de Biophysique Moléculaire
CNRS UPR4301
Rue Charles Sadron
45071 ORLEANS Cedex 2

