



HAL
open science

Synthèse de ligands de type bispidine pour la complexation du manganèse (II) et leurs applications à l'imagerie

Maryame Sy

► To cite this version:

Maryame Sy. Synthèse de ligands de type bispidine pour la complexation du manganèse (II) et leurs applications à l'imagerie. Autre. Université de Strasbourg, 2021. Français. NNT : 2021STRAF065 . tel-04398313

HAL Id: tel-04398313

<https://theses.hal.science/tel-04398313v1>

Submitted on 16 Jan 2024

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien

THÈSE présentée par :

Maryame SY

soutenue le : **16 décembre 2021**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie

**Synthèse de ligands de type bispidine
pour la complexation du manganèse(II)
et leurs applications à l'imagerie**

THÈSE dirigée par :

Dr CHARBONNIERE Loïc

Directeur de thèse, CNRS Strasbourg

RAPPORTEURS :

Prof. TRIPIER Raphaël

Rapporteur externe, Université de Bretagne Occidentale

Prof. BODIO Ewen

Rapporteur externe, Université de Bourgogne

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr JAKAB TOTH Eva

Examinatrice, Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans

Dr NONAT Aline

Co-encadrante de thèse, CNRS Strasbourg

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de thèse le Dr Loïc Charbonnière pour m'avoir accepté dans son laboratoire pour mon stage de master et de m'avoir permis de poursuivre en thèse. Je le remercie pour m'avoir suivi durant trois années et demie, de m'avoir appris à être plus rigoureuse et de m'avoir transmis des connaissances. Tout cela a toujours été fait dans la bienveillance et dans un environnement agréable dont seul un SynPA-tron a le secret. Je vous remercie également de m'avoir permis de participer à ces des conférences et pour m'avoir permis d'effectuer mon plus long voyage à Singapour.

Je tiens ensuite à remercier la personne qui m'a accompagné depuis mon stage de master, ma co-encadrante de thèse le Dr Aline Nonat. Je la remercie pour son enthousiasme, sa constante disponibilité, sa gentillesse et pour m'avoir initié au monde des bispidines. Ton optimisme sans égal fût une réelle source de motivation pour moi durant ces années. Merci, à toi aussi, de m'avoir permis de présenter mes travaux lors de conférences.

Je remercie le Dr Eva Jakab Toth pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, au Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans, durant la dernière année de ma thèse. Je la remercie pour sa bienveillance, sa bonne humeur communicative et pour m'avoir permis de bénéficier de son expertise sur les agents de contraste.

Je souhaite remercier le Prof. Raphaël Tripiet et le Prof. Ewen Bodio pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'évaluer mes travaux.

Je tiens à remercier l'ensemble des personnes impliquées dans ce sujet. Je remercie d'abord Daouda Ndiaye pour sa collaboration et pour avoir pris le temps de me former aux différentes techniques du laboratoire. Je le remercie pour sa gentillesse et d'avoir toujours eu le temps de répondre à mes questions. Je remercie le Dr Sara Lacerda pour avoir effectué le radiomarquage des ligands. Je la remercie aussi pour sa bienveillance tout au long de ma présence au CBM et pour les discussions que nous avons pu avoir. Je remercie Agnès Pallier pour l'étude de biodistribution. Je la remercie aussi pour sa gentillesse, son aide au laboratoire de chimie analytique et avec le relaxomètre capricieux. Je remercie le Dr Sandra Mème pour avoir réalisé l'étude IRM et pour sa sympathie. Je remercie le Dr Isidro Da Silva du CEHMTI pour avoir produit du manganèse 52, le Dr Stephanie Lerondel et Julien Sobilo du CIPA pour les études in vivo et le Dr Vincent Aucagne et Jean-Baptiste Madinier du CBM pour la réaction de bioconjugaison.

Ces trois années furent pour moi, une très belle aventure humaine, rythmée par toutes les personnes que j'ai pu côtoyer et avec qui j'ai partagé de beaux moments. Je remercie Zouhair pour sa bonne humeur et pour s'être toujours soucie de notre bien-être. Je remercie Alex, l'homme aux multiples casquettes. Merci d'avoir toujours fait de ton possible pour trouver des solutions à nos problèmes. Je remercie Cécile pour ses ondes positives et sa joie de vivre communicative. Je remercie Clémence, ma camarade de voyage, pour sa sympathie et son humour. Je remercie notre PDG, Joan, pour sa gentillesse et ses conseils. J'espère que tu ne nous oublieras pas lorsque tu seras au dernier étage de ton gratte-ciel. Je remercie Cyrille pour son humour, pour la bonne ambiance qu'il a apporté au laboratoire.

Je remercie Mohamadou, mon frère/collègue(/chauffeur) pour sa bonne humeur au laboratoire mais aussi pour sa présence et son soutien durant mes huit années d'étude. Je remercie mes camarades de bureau, Elsa, pour sa gentillesse et pour toutes les discussions que nous avons eu, Ali pour sa sympathie et Rich pour sa bienveillance et ses conseils. Je remercie notre artiste, Kevin pour sa joie de vivre en toute circonstance. Je remercie mon voisin de paillasse, Mainak pour sa gentillesse. Je tiens aussi à remercier tous les étudiants que j'ai pu croiser au labo SynPA : Gemma, Fanny, Nicolas, Chen, Jenny, Lena, Anli (à qui je passe le flambeaux des bispidines), Jiafeng, Rasha. Merci aussi à tous ceux que j'aurais pu oublier à l'instant où j'écris ces quelques mots.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes que j'ai pu rencontrer durant mon année au CBM. Merci à Célia pour sa bonne humeur constante, Jean-François et Fred pour leur sympathie. Je remercie Harlei, Martina, Tea, Léa et Loeza que j'ai eu la chance de croiser durant cette année et qui l'ont rendu encore plus belle.

Je tiens à remercier mes amis, Malik et Nada pour leur présence depuis bientôt 10 ans. Chacune de nos retrouvailles ne sont que des bons moments composés de fou rire. J'espère vous compter dans ma vie encore très longtemps. Je remercie aussi mon amie Guzide, bien que nous n'ayons pas eu le temps de nous voir souvent ces trois années, nous savons que nous pouvons compter l'une sur l'autre.

J'ai la chance de pouvoir m'appuyer sur une grande, drôle et belle famille. Je remercie mes sœurs et frères sur qui j'ai pu, je peux et je pourrai toujours compter : Aïssata, Hawa, Mohamadou (encore une fois), Sinna (mon acolyte de Strasbourg), Seykou et Ramata.

Je tiens à remercier en particulier mes parents qui ont fait de moi la personne que je suis. Je les remercie pour m'avoir appris à toujours faire de mon mieux et pour m'avoir transmis de belles valeurs. Vous rendre fière, est pour moi, la meilleure des récompenses.

Enfin, je tiens à remercier mon mari Mamoudou pour son soutien sans faille durant cette période particulière de ma vie et aussi pour toutes les futures étapes que la vie nous réserve.

A ma famille,

Table des matières

CHAPITRE I : Introduction

1.	Les techniques d'imagerie médicale.	1
1.1.	L'Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire (IRM).	3
1.1.1.	Généralités.	3
1.1.2.	Principe de l'Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire (IRM).	3
1.1.3.	Les agents de contraste.	7
1.2.	La Tomographie à Emission de Positron.	26
1.2.1.	Généralités.	26
1.2.2.	Principe de la TEP.	27
1.2.3.	L'avantage des radionucléides à long temps de demi-vie pour l'immunoTEP.	29
1.3.	L'utilisation du Mn(II) pour l'imagerie bimodale TEP/IRM.	36
1.3.1.	Avantage de la bimodalité.	36
1.3.2.	Cahier des charges et état de l'art des complexes de manganèse (II) pour l'IRM. .	38
2.	Les bispidines : Structure rigide et préorganisée.	56
2.1.	Généralités.	56
2.2.	Les radiotraceurs à base de bispidine.	59
2.2.1.	Radiomarquage des bispidines au cuivre ⁶⁴	59
2.2.2.	Radiomarquage avec d'autres radioisotopes.	67
2.3.	Les bispidines pour la complexation du manganèse(II/III).	73
3.	Contexte du travail de thèse.	76
4.	Références.	78

CHAPITRE II : Synthèse

1.	Présentation des différentes voies synthétiques.	89
1.2.	Schéma de rétrosynthèse.	89
1.3.	Synthèse des précurseurs P₁ et P₂	90
1.4.	Synthèse du squelette bispidol via l'utilisation de la 2,4-diméthoxybenzylamine.	92
2.	Synthèse des bispidines avec un bras dérivé des acides aminés.....	95
2.1.	Synthèse du ligand L₁	95
2.2.	Synthèse du ligand L₂	96
2.3.	Synthèse du ligand L₃	99
2.4.	Synthèse du ligand L₄	100
3.	Synthèse des bispidines avec un bras dérivé du méthylèncarboxylate.....	101
3.1.	Synthèse des ligands L₅ et L₆	101
3.2.	Synthèse du ligand L₇	104
3.3.	Synthèse du ligand L₈	106
4.	Synthèse de la bispidine phosphonaté L₉	107
5.	Conclusion.....	109
6.	Références	110

CHAPITRE III : Etudes Physico-Chimiques

1.	Etude de la stabilité thermodynamique.	111
1.1.	Généralités.....	111
1.1.1.	Objectif	111
1.1.2.	Définition de la stabilité thermodynamique d'un complexe.....	112
1.2.	Etude des bispidines avec un bras dérivé des acides aminés.....	113
1.3.	Etude des bispidines avec un bras dérivé du méthylèncarboxylate.....	115
1.4.	Etude de la bispidine phosphonaté L₁₀	119
1.5.	Conclusion.....	121

2.	Etude de l'inertie cinétique.....	122
2.1.	Objectif.....	122
2.2.	Définitions de l'inertie cinétique d'un complexe.	123
2.3.	Etudes des bispidines avec un bras dérivé des acides aminés.	125
2.4.	Etudes des bispidines avec un bras dérivé du méthylèncarboxylate.	129
2.5.	Etudes de la bispidine avec un bras phosphonaté MnL ₁₀	133
2.6.	Conclusion.....	134
3.	Etude de la relaxivité.	134
3.1.	Etudes des complexes avec des bispidines possédant un bras dérivé des acides aminés.	135
3.2.	Etudes des complexes avec des bispidines possédant un bras dérivé du méthylèncarboxylate.....	140
3.3.	Etude du complexe MnL ₁₀ avec une bispidine phosphonagée.....	143
4.	Conclusion et comparaison des différents systèmes.	145
5.	Références	146
CHAPITRE IV : Fonctionnalisation et Application en IRM et en TEP		
1.	Fonctionnalisation.	148
2.	Radiomarquage de L ₁ au manganèse 52 et étude <i>in vivo</i> en TEP.	151
3.	Etude IRM <i>in vivo</i> avec le complexe MnL ₁	153
4.	Références.	155
CHAPITRE V : Conclusion générale.....		
CHAPITRE VI : Partie Expérimentale		
Abréviations		
Communications orale et Publications.....		

CHAPITRE I

Introduction

1. Les techniques d'imagerie médicale.

Les techniques d'imagerie médicale sont des outils indispensables de la médecine actuelle. Elles permettent de visualiser l'intérieur du corps humain et selon la technique choisie d'en tirer des informations anatomiques ou métaboliques. Elles sont donc indispensables à l'élaboration d'un diagnostic fiable. Les principales techniques utilisées quotidiennement en milieu hospitalier sont les suivantes :

L'échographie : Elle peut être utilisée pour visualiser quasiment toutes les parties du corps. Elle est, entre autres, un outil indispensable pour le suivi des grossesses. Elle est basée sur l'utilisation des ultrasons. Une sonde va émettre des ultrasons dont la propagation ou la réflexion va dépendre des différents milieux rencontrés. En mesurant le temps entre l'émission et la réception de l'écho, on peut calculer la distance parcourue et obtenir une image.¹

La radiographie par rayon X : il s'agit de la technique d'imagerie la plus ancienne. La région à imager est irradiée par un faisceau de rayon X. Ce dernier traverse les tissus en étant atténué différemment selon les différentes densités des tissus. Cette atténuation peut être modifiée par l'utilisation de produit de contraste tel que l'iode.²

L'imagerie par résonance magnétique nucléaire : Elle utilise la résonance magnétique des spins des atomes d'hydrogène de l'eau présents dans les tissus. La densité des protons et leur relaxation nucléaire étant différentes dans chaque tissu, l'intensité du signal IRM est différente d'un tissu à l'autre ce qui permet d'avoir des images de haute résolution. On peut améliorer la qualité de l'image en injectant un agent de contraste paramagnétique.

Les techniques utilisant la radioactivité : elles consistent en l'injection, généralement par voie intraveineuse, d'un radiotraceur dont les photons gamma (γ) émis sont détectés par des caméras gamma. Il existe deux techniques utilisant la radioactivité. La première est la Tomographie à Emission Monophotonique (TEMP) pour laquelle des émetteurs de photon γ tels que ^{99m}Tc , ^{123}I , ^{111}In , ^{201}Tl , et ^{67}Ga sont injectés. Le photon γ émis est issu de désintégrations radioactives. La seconde technique est la Tomographie à Emission de Positrons (TEP). Dans ce cas, ce sont des émetteurs de positrons tels que ^{18}F , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{76}Br et ^{124}I qui sont utilisés. C'est finalement une réaction d'annihilation entre le positrons émis et un électron du milieu qui

permet l'éjection de deux photons γ qui seront ensuite détectés. Ces deux techniques sont utilisées en médecine nucléaire et particulièrement en oncologie^{1,3}.

L'imagerie optique médicale repose sur l'utilisation de la lumière pour l'observation d'un corps. Du fait du développement rapide des techniques d'imagerie utilisées actuellement en routine (IRM, rayon X, médecine nucléaire...) l'imagerie médicale optique a longtemps été mise de côté notamment à cause des phénomènes de diffusion et d'absorption. En effet, lorsqu'un photon traverse un tissu, la trajectoire de ce dernier est modifiée plusieurs fois par des diffusions successives, ce qui limite la résolution. De plus, la fenêtre de transparence des tissus biologiques se situant dans la région proche-infrarouge, l'observation des tissus ne peut se faire qu'à quelques centimètres de profondeur. L'avantage de cette technique repose néanmoins sur son caractère non invasif, son faible coût et sa sensibilité, notamment par l'utilisation de sondes fluorescentes. Actuellement, l'imagerie optique est couramment utilisée en ophtalmologie dans une technique appelée tomographie par cohérence optique (OCT). Elle consiste à distinguer les photons non diffusés dits « balistiques », des photons diffusés par l'utilisation d'interférences avec des sources de faible cohérence comme les lampes à halogène. Différentes coupes de l'objet sont alors obtenues et leurs superpositions permet la reconstruction tridimensionnelle de l'image de l'objet.⁴

Dans le cadre de cette thèse et du fait des propriétés du manganèse(II), nous nous intéresserons particulièrement à l'IRM et la TEP. Ces deux techniques seront présentées plus en détail dans les parties suivantes.

1.1. L'Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire (IRM).

1.1.1. Généralités.

L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est une technique d'imagerie non invasive utilisée en médecine pour le diagnostic de maladies telles que les cancers et les neuropathologies. Elle repose sur le principe de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Elle fut développée grâce aux travaux de Raymond Vahan Damanian qui, en 1969⁵, fut le premier à énoncer la possibilité d'utiliser le principe de la résonance magnétique nucléaire pour faire de l'imagerie du corps humain. Par la suite, les travaux des groupes de Lauterbur et Mansfield entre 1973 et 1974 ont permis de montrer que l'on pouvait obtenir des images 2D et potentiellement 3D par RMN^{6,7}. En 1977, Damanian et ses collaborateurs réalisaient la première image du corps humain par IRM (Figure 1.1)⁸ et c'est en 1980 que le premier scanner IRM fût finalement commercialisé.



Figure 1.1 : Première image IRM du corps humain, coupe transversale de la poitrine.⁸

1.1.2. Principe de l'Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire (IRM).

A) La résonance magnétique nucléaire (RMN)

Pour comprendre le principe de l'IRM, il faut d'abord connaître les bases de la RMN dont elle est issue. En effet, en IRM on s'intéresse principalement à la résonance magnétique des spins nucléaires des atomes d'hydrogène (nommés protons par abus de langage) présentes dans les tissus.

En présence d'un champ magnétique B_0 , les spins vont précesser autour de ce champ de deux façons correspondant à deux états d'énergie : soit les spins précessent de manière parallèle au

champs magnétique B_0 , peuplant ainsi l'état de basse énergie, soit de manière antiparallèle à B_0 , qui correspond au niveau de plus haute énergie. D'après la distribution de Boltzmann, les protons vont peupler préférentiellement le niveau de plus basse énergie. On obtient finalement un moment magnétique total M_0 qui sera orienté dans le même sens que B_0 (Figure 1.2.a). Un pulse de radiofréquence B_1 est alors appliqué et fait basculer M_0 perpendiculairement à B_0 (Figure 1.2.b). A la fin du pulse, M_0 retourne à l'équilibre en émettant une fréquence ; c'est la relaxation. Cette fréquence est ensuite enregistrée par une bobine réceptrice sur l'axe y et le signal analogique est convertit en signal FID qui permettra d'obtenir le spectre RMN après transformation de Fourier. (Figure 1.2. c, d et e).

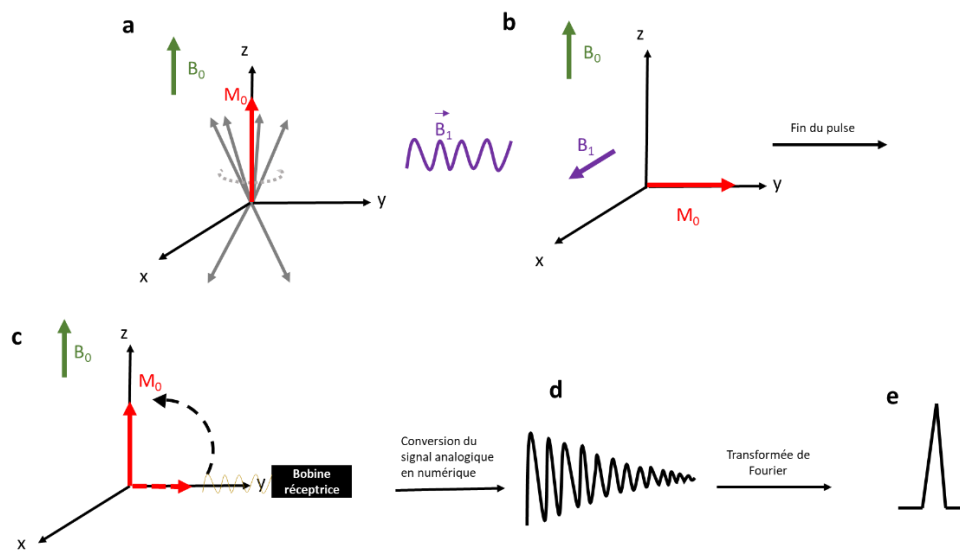


Figure 1.2 : Principe de la RMN a) Moment magnétique total M_0 des spins dans le champs magnétique B_0 b) Le pulse de radiofréquence B_1 fait basculer M_0 perpendiculairement à B_0 . c) Fin du Pulse : M_0 retourne à l'équilibre en émettant une fréquence enregistrée sur l'axe y par une bobine réceptrice. d) Le signal analogique est convertit en FID e) La transformée de Fourier permet d'obtenir le spectre RMN.

Un principe similaire est utilisé en IRM et le contraste de l'image est directement lié au temps de relaxation des spins lors de l'étape 1.2.c.

Il existe deux types de relaxation :

- La relaxation longitudinale T_1 selon l'axe z pour laquelle une augmentation exponentielle du moment magnétique est observée lors du retour à l'équilibre (Figure 1.3.a).

- La relaxation transversale T_2 , selon le plan xy pour laquelle le retour à l'équilibre entraîne une diminution exponentielle du moment magnétique (Figure 1.3.b).⁹

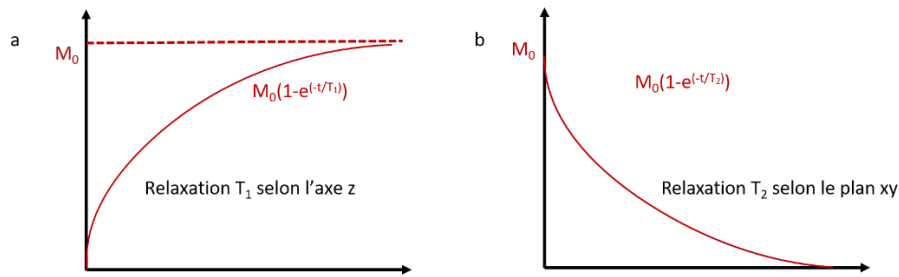


Figure 1.3 : Relaxation a) longitudinale T_1 selon l'axe z . b) transversale T_2 selon le plan xy

B) De la RMN à l'imagerie médicale : les gradients de champs magnétiques

Avec l'IRM, on utilise la résonance magnétique pour accéder à des images tridimensionnelles. Un encodage spatial est possible grâce à l'utilisation de gradients de champs magnétiques linéaires. Les gradients sont appliqués par pulse et s'additionnent à B_0 . Ils sont appliqués par trois paires de bobine de fils. Elles sont placées autour du tunnel de l'aimant (Figure 1.4). Lorsqu'elles sont traversées par un courant électrique, chaque bobine réalise une variation de l'intensité du champ magnétique présent dans le tunnel. Cette variation va modifier la fréquence de mutation et de rotation des protons et va permettre de sélectionner les coupes pour lesquelles les protons vont entrer en résonance avec l'onde radio alors que les autres protons ne seront pas affectés.

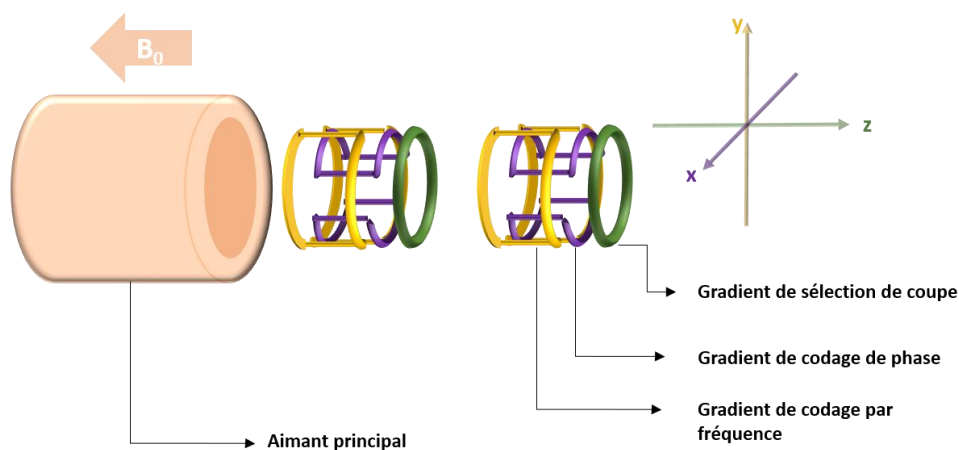


Figure 1.4 : Disposition des gradients de fréquence dans les trois positions de l'espace

Ainsi, lors d'une analyse IRM, en plus de B_0 , on applique d'abord un gradient de sélection de coupe (GSC) sur le plan z (Figure 1.4). Il permet de sélectionner une épaisseur de tissu. Au même moment, le pulse de radiofréquence B_1 est appliqué et excite uniquement les protons présents dans la coupe (Figure 1.5).

Ensuite, un gradient de codage de phase (GCP) est appliqué sur le plan y (Figure 1.4). Il modifie la fréquence de précession des spins et induit un décalage de phase. A l'interruption du gradient, les spins de la coupe ont tous la même fréquence mais ils sont déphasés d'une ligne à l'autre selon l'axe y (Figure 1.5). Enfin, un gradient de codage par fréquence (GCF) est finalement appliqué sur le plan x (Figure 1.3). Il modifie la vitesse de précession des spins d'une colonne à l'autre (selon l'axe x) et reste allumé pendant toute la durée de l'enregistrement du signal. Ainsi, on obtient pour chaque coupe de tissu des voxels (unités de volume) caractérisés par leur propre phase et leur propre fréquence de précession en fonction de leur position (x, y) (Figure 1.4)⁹.

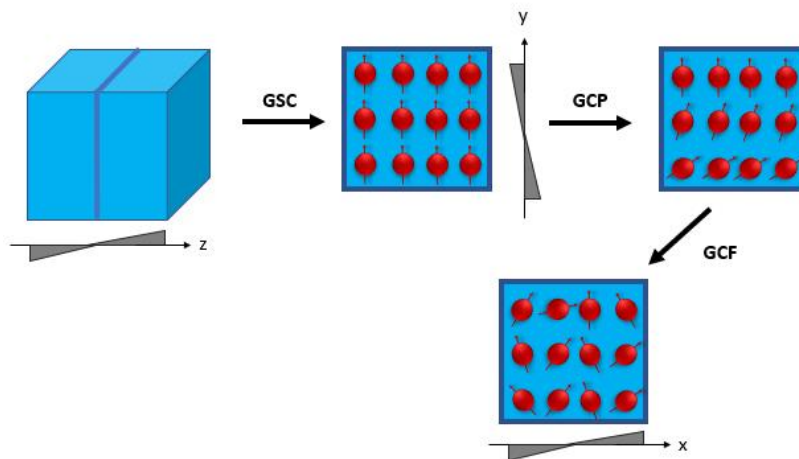


Figure 1.5 : Représentation schématique des gradients

Ces données brutes sont stockées dans un espace appelé espace de Fourier ou « k-space ». Un traitement par transformée de Fourier inverse permet finalement d'accéder à l'image IRM (Figure 1.6).

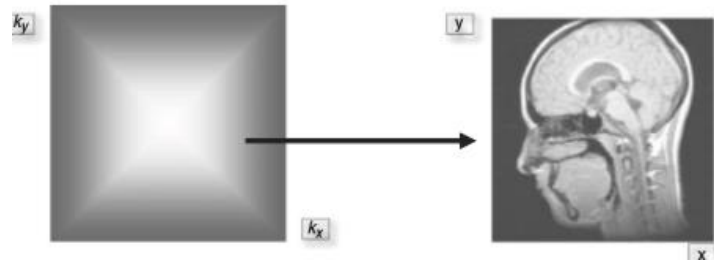


Figure 1.6 : Conversion du « k-space » en image par la transformée de Fourier inverse⁹.

Les images IRM obtenues sont alors en niveaux de gris dont la couleur varie en fonction de l'intensité du signal. Le contraste des images va premièrement dépendre de la composition en eau (et plus précisément d'atome d'hydrogène) des tissus mais il peut aussi être varié en jouant sur les séquences IRM. La séquences IRM est une série de pulses de radiofréquence, de gradients et de temps d'intervalle dont l'assemblage permet d'obtenir le contraste désiré.

Il existe différents types de contraste en fonction des deux types de relaxation T_1 et T_2 ainsi qu'en fonction de la densité d'eau. Lorsque l'on joue sur la densité des protons des tissus, on parle d'une image pondérée en densité de protons (Figure 1.7). Lorsque l'on modifie les paramètres de séquence pour réduire le temps de la relaxation longitudinale T_1 , on parle d'une image pondérée en T_1 . Le contraste est alors positif et les zones dont le signal est le plus intense sont les plus claires (Figure 1.7).

De même, lorsque l'on fait diminuer le temps de relaxation transversale T_2 on parle d'une image pondérée en T_2 , le contraste est négatif et les zones dont le signal est le plus élevé sont les plus foncées. (Figure 1.7)¹⁰.

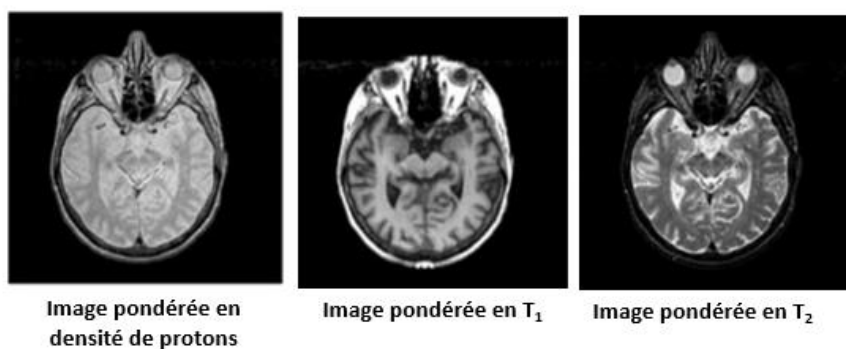


Figure 1.7 : Image IRM d'une coupe de cerveau humain avec différents contrastes d'une coupe de cerveau humain.

1.1.3. Les agents de contraste.

Malgré la haute résolution des images IRM, il est souvent nécessaire pour certaines analyses d'injecter un produit de contraste qui va augmenter la qualité de l'image. Cependant, ce n'est pas le produit qui est directement observé. En effet l'agent a pour rôle de diminuer le temps de relaxation des molécules d'eau ce qui va augmenter le signal des différents tissus et donc le contraste. Ces agents sont généralement des complexes ou des assemblages d'ion métalliques (M^{n+}), dont les propriétés paramagnétiques permettent d'influencer la relaxation. Pour des raisons de toxicité, ces systèmes doivent être suffisamment stables thermodynamiquement et inertes cinétiquement pour être appliqués en milieu biologique. Enfin, une interaction du métal avec les molécules d'eau du milieu est indispensable à l'efficacité de l'agent de contraste.

Nous allons dans une première partie présenter les agents de contraste commerciaux et ceux qui ont été utilisés lors d'essais cliniques. Il s'agira ensuite de présenter l'aspect théorique de la relaxation des agents moléculaires afin de comprendre quels paramètres sont impliqués dans la diminution du temps de relaxation.

A) Les agents de contraste commerciaux et utilisés lors d'essais cliniques.

a. Les agents de contraste à base de gadolinium.

Tous les agents de contraste actuellement disponibles commercialement en France sont des complexes à base de gadolinium(III). Chaque année, ce sont plus de 50 tonnes de gadolinium qui sont administrés.¹¹ Ce lanthanide, avec en général un nombre de coordination de neuf, est hautement paramagnétique ($S = 7/2$) et a un long temps de relaxation électronique⁸. Ces deux dernières 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 des protons.

Ces agents de contraste à base de gadolinium sont tous composés d'un ligand polyaminopolycarboxylate octadentate et d'une molécule d'eau comme co-ligand. Ils sont divisés en deux familles, les linéaires et les macrocycliques. Les complexes linéaires sont composés du ligand acide 1,1,4,7,7-diéthylènetriaminepentaacétique (DTPA) et de ses dérivés (voir Tableau 1.1).¹² En 2017, l'agence européenne du médicament a décidé de suspendre leur utilisation pour des raisons de toxicité qui seront discutées dans un prochain paragraphe. Seuls les agents de contraste linéaires MutiHance® et Primovist® sont toujours utilisés, mais ils ne

sont autorisés que pour l'imagerie du foie. Les complexes macrocycliques sont composés du ligand acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7-10-tétraacétique (DOTA) et de ses dérivés. Ils sont beaucoup plus stables que les complexes linéaires, c'est la raison pour laquelle ils sont toujours autorisés. Les agents de contraste à base de gadolinium réduisent la relaxation en T₁ mais aussi en T₂. Néanmoins, l'effet du gadolinium comme agent de contraste est plus prononcé en T₁ dans les tissus. C'est pourquoi ils sont généralement considérés comme des agents T₁ avec une relaxivité moyenne de 4 mM⁻¹.s⁻¹ (20 MHz, 25 °C).²¹ Ces agents (à part pour MultiHance® et Primovist®) ne sont spécifiques à aucun organe. Après leur injection par voie intraveineuse, ils traversent le cœur, sortent des artères systémiques et atteignent les zones extracellulaires. Ils sont principalement utilisés pour visualiser des dommages au niveau des artères ou des tissus endothéliaux.²¹

Nom(s) commercial(iaux)	Formule chimique	Approuvé en	Statut
Magnevist®	Gd-DTPA	1988	Suspendu
Omniscan®	Gd-DTPA-BMA	1994	Suspendu
Multihance®	Gd-BOPTA	1998	Uniquement pour l'imagerie du foie
Primovist®	Gd-EOB-DTPA	2020	Uniquement pour l'imagerie du foie
Dotarem®, Artirem®, Clariscan®	Gd-DOTA	1989	Maintenu
Gadovist®	Gd-DO3A-butrol	2000	Maintenu
ProHance®	Gd-HP-DO3A	1994	Maintenu

Tableau 1.1 : Agents de contraste commerciaux à base de gadolinium

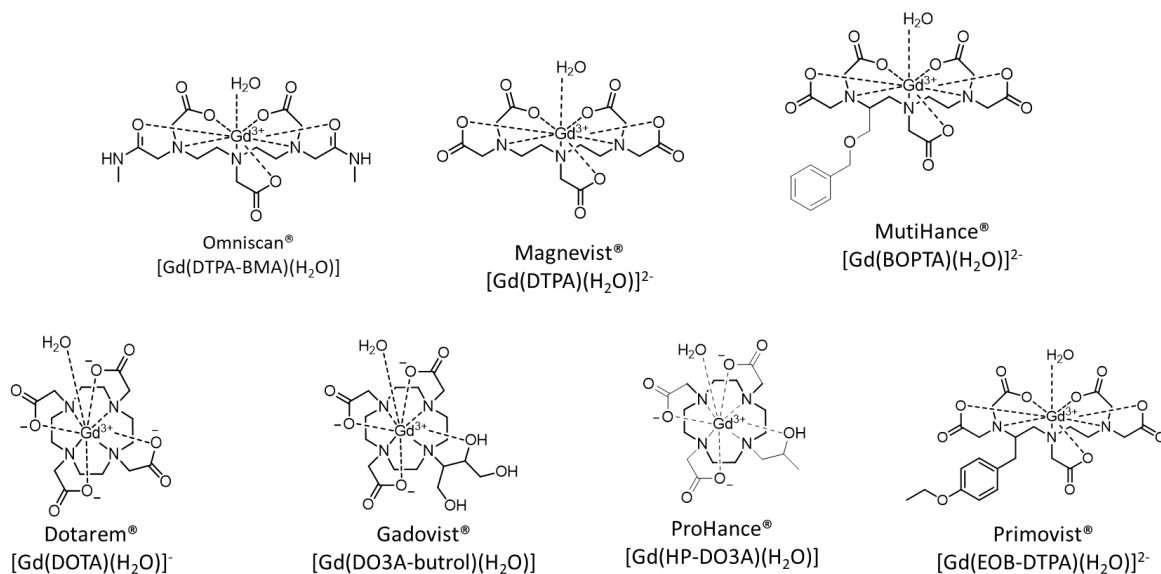


Figure 1.11 : Structures des agents de contraste commerciaux à base de gadolinium

Tous ces agents sont qualifiés « d’agent de contraste de première génération ». Après injection ils diffusent rapidement vers le milieu extracellulaire et ont de ce fait une faible spécificité. Il existe aussi des agents de contraste à base de gadolinium spécifiques. Par exemple, le gadobénate de diméglumine (MultiHance ®) et le gadoxétate disodique (Primovist®) sont rapidement pris en charge par les hépatocytes et sont donc utilisés pour l’imagerie du foie et du système biliaire.^{13,14} D’autres agents spécifiques dit « de deuxième génération » ont été utilisés lors d’essais cliniques mais ne sont pas disponibles sur le marché. À titre d’exemple, des complexes de gadolinium ont été développés pour l’angiographie. Deux méthodes ont été utilisées pour favoriser leur rétention dans les vaisseaux sanguins et ralentir leur diffusion vers le milieu interstitiel. La première consiste à utiliser un ligand tels que le B22956¹⁵ qui interagit de manière non covalente avec l’albumine sérique et le force ainsi à rester dans le système vasculaire (Figure 1.12). La seconde est d’utiliser un complexe de très grande taille tel que le Gadomer-17¹⁶ (Figure 1.12) ce qui va nettement ralentir sa diffusion vers le milieu interstitiel et l’inciter à rester à l’intérieur des vaisseaux sanguins. L’intérêt de ces systèmes est double : (i) l’accumulation de l’agent de contraste dans les vaisseaux sanguins permet un meilleur contraste, (ii) la formation d’espèces de grandes tailles permet d’atteindre des relaxivités élevées aux champs moyens des scanners IRM commerciaux (20-60 MHz).

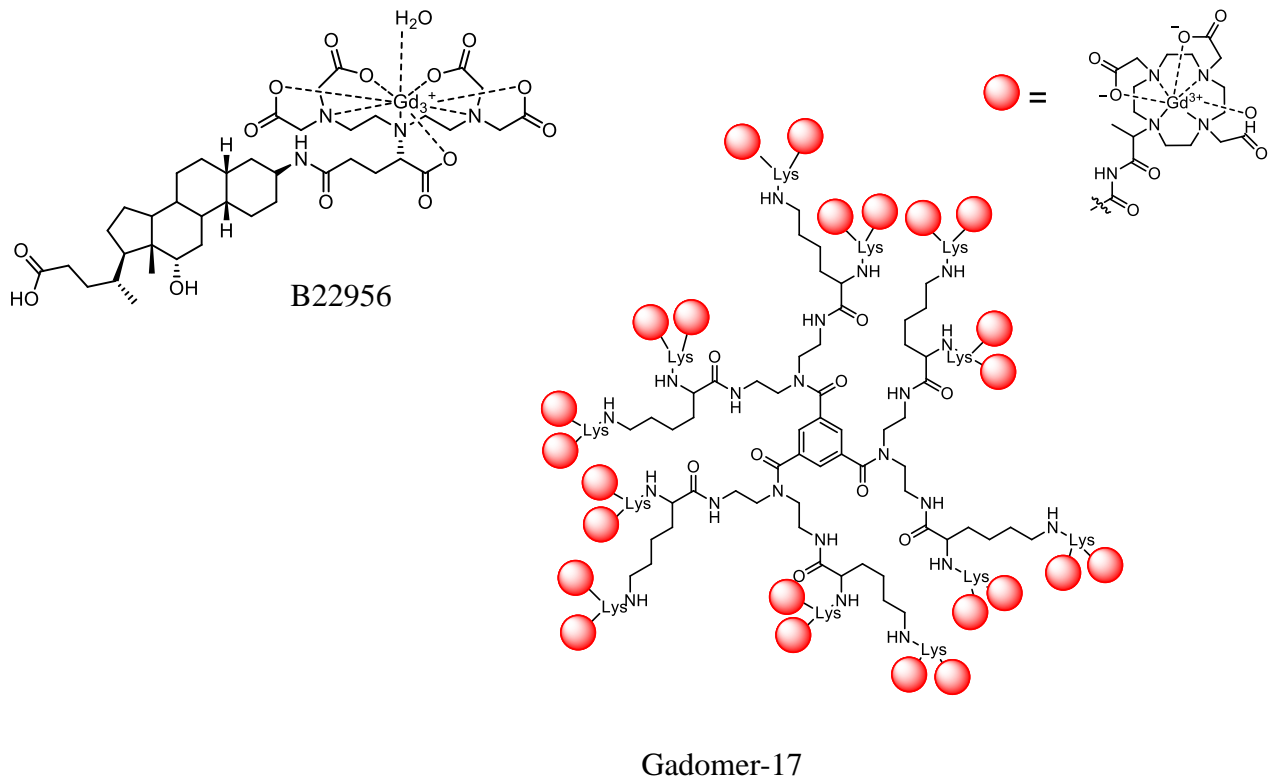


Figure 1.12 : Exemples d'agents de contraste à base de gadolinium pour l'angiographie.

L'ion gadolinium(III) a une taille similaire à celle du calcium(II). De ce fait, il peut interférer dans les processus biologiques impliquant le Ca²⁺. Il est donc nécessaire que le gadolinium(III) soit piégé dans un complexe afin d'éviter cette toxicité.¹⁷ En 2006, Grobner et *al.* ont mis en avant pour la première fois un lien entre l'utilisation du Gd-DTPA et une pathologie grave chez des patients souffrant d'insuffisances rénales, la Fibrose Systémique Néphrogénique (FSN).¹⁸ Cette maladie se caractérise par la formation de fibroses sur la peau qui peuvent s'étendre aux organes vitaux. Bien que l'origine exacte de cette maladie ne soit pas connue, il a aussi été montré que des patients souffrant de FSN présentaient dans leurs tissus¹⁹ des traces de gadolinium, renforçant ainsi l'hypothèse d'un lien entre cette maladie et l'exposition à ce métal.

De plus, le complexe de Gd³⁺ est principalement éliminé par les reins. L'efficacité de filtration des reins est caractérisée par le débit de filtration glomérulaire (DFS). Plus le DFS est élevé, plus l'élimination sera rapide. Il a été montré que pour les patients ayant un DFS faible, l'élimination du gadolinium était beaucoup plus lente (augmentation de 4 à 8 h pour des insuffisances rénales modérées et 18 à 34 h pour les cas les plus graves) que pour les patients

avec un DFS normal.²⁰ Cette exposition prolongée au Gd^{3+} pourrait donc être une des causes de développement de la FSN chez les patients souffrant d'insuffisance rénales. Ces craintes concernent principalement les agents de contraste linéaires qui sont les principaux concernés dans ces études à cause d'une stabilité cinétique beaucoup plus faible que les agents de contraste macrocycliques.²¹ Ces découvertes ont conduit l'agence européenne du médicament, en 2010, à limiter l'utilisation des agents de contraste linéaires sur les femmes enceintes et les patients souffrant d'insuffisances rénales.

Depuis 2013, d'autres études ont montré que l'injection répétée d'agent de contraste à base de Gd^{3+} pouvait conduire à une accumulation de ce dernier dans différents tissus.²² En effet, une analyse sur des cerveaux issus de corps autopsiés a montré une accumulation de gadolinium dans les noyaux dentelés et dans le globus pallidus.²³ D'autres études ont également montré des dépôts de gadolinium dans les os chez des patients n'ayant pas de problèmes rénaux.²⁴ Pour le moment, aucune toxicité n'a été attribuée à ces dépôts. Néanmoins, en 2017, l'agence européenne du médicament a décidé de suspendre l'utilisation de certains complexes linéaires (voir Tableau 1.1) dont l'inertie cinétique a été mise en cause par des études *in vivo*.²⁵

b. Les agents de contraste à base de manganèse(II).

Le manganèse(II) a aussi été utilisé dans le développement d'agent de contraste. Il est paramagnétique avec un spin de $S = 5/2$ et il possède un long temps de relaxation électronique. La vitesse d'échange de l'ion manganèse(II) avec les molécules d'eau est suffisamment élevée pour ne pas limiter la relaxivité. De plus, c'est un élément biogénique ; il est présent dans le sérum à des concentrations de 0,5 à 1,2 $\mu\text{g/l}$ mais aussi dans des enzymes tels que la superoxyde dismutase qui joue un rôle majeur dans l'élimination des radicaux libres. Un autre avantage à l'utilisation de ce métal est son coût. En effet, le chlorure de manganèse est soixante fois moins cher que le chlorure de gadolinium, ce qui devrait ainsi diminuer le prix de l'agent de contraste. Seul deux agents de contraste à base de manganèse ont été utilisés en clinique. Le premier est le Mn-DPDP (Teslascan®), il était utilisé pour l'imagerie du foie et du myocarde (Figure 1.13)²⁶. Il a été retiré du marché en 2012 du fait d'un manque de stabilité *in vivo*. Le second est composé de chlorure de manganèse encapsulé dans des liposomes qui est un agent administré par voie orale.

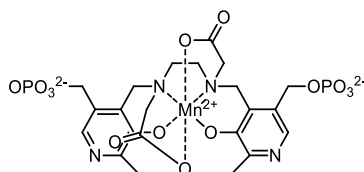


Figure 1.13 : Structure de l'agent de contraste Teslascan®

c. Les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques.

Les nanoparticules d'oxydes de fer superparamagnétiques (SPION) sont des particules superparamagnétiques composées de maghémite (Fe_2O_3) ou de magnétite (Fe_3O_4) et sont recouvertes d'un agent tel que le dextran, le citrate, ou l'oléate. Ces agents empêchent les agrégations et réduisent la toxicité des particules. Le spin total de ces particules est supérieur à la somme des spins individuels de chaque ion métallique et conduit donc à des relaxivités très élevées. Ces particules superparamagnétiques affectent beaucoup plus T_2 que T_1 et sont donc considéré comme des agents T_2 . Elles sont classées en trois groupes en fonction de leur taille²⁷ :

- USPIO (Ultra small, <50 nm)
- SPIO (Small, 50 nm à 1 μm)
- MPIO (Micron-sized, >1 μm)

Des oxydes de fer superparamagnétiques ont déjà été utilisés lors d'essais cliniques et ont déjà été approuvés par les autorités. Actuellement, seul le Lumirem[®], un agent de contraste administré par voie orale est présent sur le marché mais peu utilisé.²⁷ Pour les autres, leurs développements ont été arrêtés en phase d'essai clinique ou ils ont été retirés du marché car, bien qu'ils soient jugés biocompatibles, des problèmes de toxicité ont été mis en avant. D'abord, la métabolisation des SPION risquait d'entraîner une surcharge néfaste en fer.²⁸ Ensuite, les particules de type PEG-feron, trop résistante à la métabolisation, restaient intacte dans le foie pendant une très longue période²⁹, ce qui a entraîné l'arrêt de leur développement.

Groupe	Nom commercial	Nom générique	Relaxivité $\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$ (1,5 T, 37 °C)	Statut	Usage
USPIO	Feraheme®	Ferumoxytol	$r_1 = 15$ $r_2 = 89$	Approuvé pour le traitement de l'anémie, utilisé hors indication en IRM	Agent intraveineux, lésions cérébrales, foie ganglions lymphatiques
	Clariscan®	PEG-feron	$r_1 = 20$ (0,47 T) $r_2 = 35$ (0,47 T)	Utilisé lors d'essais cliniques	Agent intraveineux
	Sinerem® Combide®	Ferumoxtran-10	$r_1 = 19,5$ $r_2 = 87,6$	Utilisé lors d'essais cliniques	Agent intraveineux
	Resovist®	ferucarbotran	$r_1 = 9,7$ $r_2 = 189$	Retiré du marché	Foie
SPIO	Feridex®	Ferumoxides	$r_1 = 10,1$ $r_2 = 158$	Retiré du marché	Foie, Rate, Agent intraveineux, Marquage cellulaire <i>in vitro</i>
MPIO	Lumirem®	ferumoxil	$r_1 = 2$ $r_2 = 47$	Approuvé	Voie orale

Tableau 1.2 : Oxydes de fer superparamagnétiques utilisés en clinique, approuvés ou retirés du marché.

B) Définition de la relaxivité et aspect théorique des agents de contraste moléculaires.

a. Théorie de la relaxivité

Les agents de contraste augmentent la vitesse de relaxation longitudinale $1/T_1$ et transversale $1/T_2$ des noyaux. En présence d'un complexe paramagnétique, ces vitesses de relaxation sont exprimées selon le modèle développé par Solomon, Bloembergen et al^{30,31} où $1/T_1$ et $1/T_2$ correspondent à une somme des vitesses de relaxation des contributions diamagnétiques $(1/T_i)_d$ et paramagnétiques $(1/T_i)_p$ présentés dans le solvant :

$$\left(\frac{1}{T_i}\right)_{obs} = \left(\frac{1}{T_i}\right)_d + \left(\frac{1}{T_i}\right)_p \quad (i = 1, 2) \quad \text{Equation 1.1}$$

La contribution paramagnétique dépend de la concentration de l'espèce paramagnétique $[M^{n+}]$. Ainsi, on peut introduire la relaxivité de l'agent de contraste r_1 (en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) qui correspond à l'augmentation de la vitesse de relaxation des protons apportée par une concentration d'une millimole par litre d'ion paramagnétique. La relaxivité r_1 est définie par l'équation 1.2. Plus la relaxivité est élevée, plus l'agent de contraste est efficace.

$$\left(\frac{1}{T_i}\right)_{obs} = \left(\frac{1}{T_i}\right)_d + r_i[M^{n+}] \quad (i = 1, 2) \quad \text{Equation 1.2}$$

Les électrons de l'ion métallique, en présence d'un champ magnétique, subissent aussi la relaxation caractérisée par les temps relaxation électronique $T_{1,2e}$ (Figure 1.8). Cette relaxation électronique va influencer sur les protons du solvant en créant un champ magnétique local. Plus les protons seront proches du métal et plus ils seront influencés par ce dernier. C'est pourquoi, il est important qu'au moins une molécule d'eau soit directement liée au métal.

Afin de faciliter la description de la théorie de la relaxivité, on distingue trois sphères de solvation autour de l'ion métallique. D'abord, les molécules d'eau directement liées au métal correspondent à la sphère interne de coordination du complexe (IS). Ensuite, les molécules d'eau présentent grâce aux liaisons hydrogènes induites par des groupements présents sur les ligands, tels que des groupements phosphonates ou carboxylates, correspondent à la seconde sphère de coordination (2S). Enfin, les molécules d'eau diffusées à proximité du complexe correspondent à la sphère externe de coordination (OS) (Figure 1.8). Ainsi, on peut écrire que la contribution paramagnétique $(1/T_{i,p})$ définie dans l'équation 1.1 correspond à la somme des contributions paramagnétiques dans la sphère interne $(1/T_{i,p})_{IS}$, dans la seconde sphère $(1/T_{i,p})_{2S}$ et dans la sphère externe $(1/T_{i,p})_{OS}$ tels que³² :

$$\left(\frac{1}{T_{i,p}}\right) = \left(\frac{1}{T_{i,p}}\right)^{IS} + \left(\frac{1}{T_{i,p}}\right)^{OS} + \left(\frac{1}{T_{i,p}}\right)^{2S} \quad (i = 1, 2) \quad \text{Equation 1.3}$$

De même, on peut l'exprimer en termes de relaxivité par :

$$r_i = r_i^{IS} + r_i^{OS} + r_i^{2S} \quad (i = 1, 2) \quad \text{Equation 1.4}$$

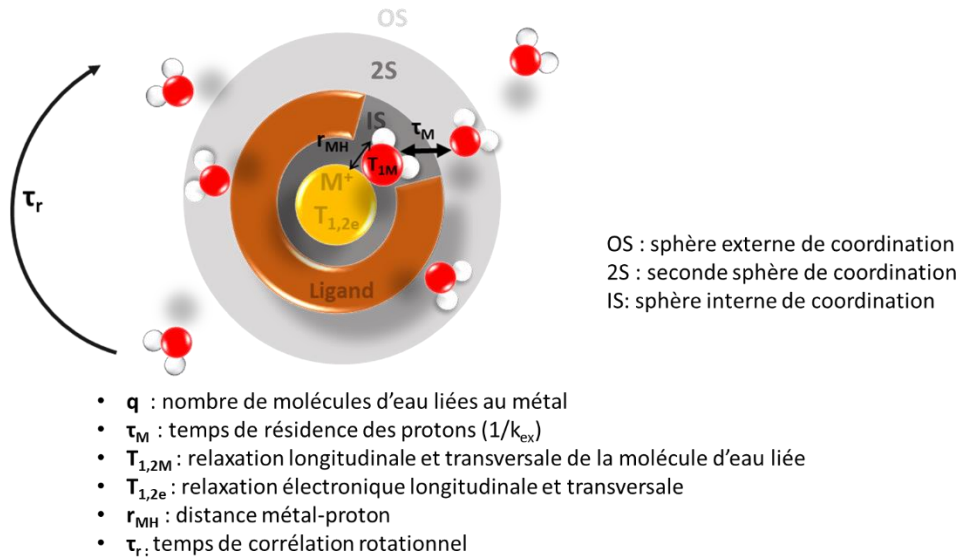


Figure 1.8 : Représentation de l'espace environnant le complexe et les paramètres influençant la relaxivité.

La Figure 1.8 montre un ensemble de paramètres qui influence la relaxivité. La plupart de ces paramètres concernent la sphère interne de coordination, c'est pourquoi il s'agit d'un élément primordial dans le développement d'agent de contraste (Figure 1.8). Ainsi, les relaxivités transversale et longitudinale de la sphère interne de coordination sont exprimées par les équations 1.5 et 1.6 :

$$r_1^{IS} = \frac{[M^{n+}]q}{55,6} \frac{1}{T_{1m} + \tau_m} = P_m \frac{1}{T_{1m} + \tau_m} \quad \text{Equation 1.5}$$

$$r_2^{IS} = \frac{P_m T_{2m}^{-2} + \tau_m^{-1} T_{2m}^{-1} + \Delta\omega_m^2}{\tau_m (\tau_m^{-1} + T_{2m}^{-1})^2 + \Delta\omega_m^2} \quad \text{Equation 1.6}$$

Où $1/T_{1m}$ et $1/T_{2m}$ sont respectivement, les vitesses de relaxation longitudinale et transversale de la molécule d'eau liée au métal, τ_m est le temps de résidence de la molécule d'eau dans la sphère interne de coordination, q est le nombre de molécule d'eau, P_m est la fraction molaire de la molécule d'eau liée au métal, $\Delta\omega_m$ est la différence de déplacement chimique entre la molécule d'eau liée au métal et celles du solvant.

Les vitesses de relaxation $1/T_{1m}$ et $1/T_{2m}$ de la molécule d'eau liée au métal sont gouvernées pas des mécanismes d'interaction dipôle-dipôle (DD) et scalaire (SC) dépendant tous les deux du champ magnétique tels que :

$$\frac{1}{T_{im}} = \frac{1}{T_i^{DD}} + \frac{1}{T_i^{SC}} \quad (i = 1, 2) \quad \text{Equation 1.7}$$

La contribution DD à la vitesse de relaxation ($1/T_i^{DD}$) est modulée par la réorientation du vecteur spin nucléaire-spin électronique, par les changements d'orientation du spin électronique (relaxation électronique) et par l'échange avec les molécules d'eau. Ainsi, $1/T_1^{DD}$ et $1/T_2^{DD}$ sont exprimées par les équations 1.8 et 1.9 :

$$\frac{1}{T_1^{DD}} = \frac{2}{15} \frac{\gamma_I^2 g^2 \mu_B^2}{r_H^6} S(S+1) \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \left[7 \frac{\tau_{c2}}{1 + \omega_S^2 \tau_{c2}^2} + 3 \frac{\tau_{c1}}{1 + \omega_I^2 \tau_{c1}^2} \right] \quad \text{Equation 1.8}$$

$$\frac{1}{T_2^{DD}} = \frac{1}{15} \frac{\gamma_I^2 g^2 \mu_B^2}{r_H^6} S(S+1) \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \left[13 \frac{\tau_{c2}}{1 + \omega_S^2 \tau_{c2}^2} + 3 \frac{\tau_{c1}}{1 + \omega_I^2 \tau_{c1}^2} + 4\tau_{c1} \right] \quad \text{Equation 1.9}$$

La contribution SC à la vitesse de relaxation ($1/T_i^{SC}$) est, quant à elle, uniquement modulée par la relaxation électronique et par l'échange des molécules d'eau tels que :

$$\frac{1}{T_1^{SC}} = \frac{2S(S+1)}{3} \left(\frac{A}{\hbar}\right)^2 \left(\frac{\tau_{e2}}{1 + \omega_S^2 \tau_{e2}^2} \right) \quad \text{Equation 1.10}$$

$$\frac{1}{T_2^{SC}} = \frac{S(S+1)}{3} \left(\frac{A}{\hbar}\right)^2 \left(\frac{\tau_{e2}}{1 + \omega_S^2 \tau_{e2}^2} + \tau_{e1} \right) \quad \text{Equation 1.11}$$

Des équations 1.7 à 1.11 on retrouve :

- $[M^{n+}]$, la concentration de l'agent de contraste ;
- T_{1m} , le temps de relaxation longitudinale de la molécule d'eau liée au métal.

- τ_m ($1/k_{ex}$), le temps de résidence de la molécule d'eau dans la première sphère de coordination du complexe.
- γ_I , le ratio gyromagnétique nucléaire du proton (MHz.T⁻¹)
- g , le facteur de Landé des électrons libres (=2)
- μ_B , le magnéton de Bohr (= 5.79 eV.T⁻¹)
- r_H la distance métal-proton (Å)
- μ_0 , la constante magnétique (= $4\pi \times 10^{-7}$ T m.A⁻¹)
- S , le nombre quantique de spin du métal
- ω_I et ω_S respectivement les fréquences de Larmor des protons et des électrons (rad.s⁻¹)
- A/\hbar , la constante de couplage scalaire ou hyperfine

Les temps de corrélations τ_{ci} et τ_{ei} sont exprimés par les équations 1.12 et 1.13 :

$$\frac{1}{\tau_{ci}} = \frac{1}{\tau_r} + \frac{1}{\tau_m} + \frac{1}{T_{ie}} \quad (i = 1, 2) \quad \text{Equation 1.12}$$

$$\frac{1}{\tau_{ei}} = \frac{1}{\tau_m} + \frac{1}{T_{ie}} \quad (i = 1, 2) \quad \text{Equation 1.13}$$

Où τ_r est le temps de corrélation rotationnel et T_{ie} le temps de relaxation électronique.

Le temps de relaxation électronique est gouverné par les modulations du ZFS transitoire (ZFS = « Zero-Field Splitting : interaction inter-électronique chez les composés paramagnétiques).

Les vitesses de relaxation électronique longitudinale $1/T_{1e}$ et transversale $1/T_{2e}$ sont exprimées par les équations 1.14 à 1.16:

$$\left(\frac{1}{T_{1e}}\right)^{ZFS} = 2C \left(\frac{1}{1 + \omega_S^2 \tau_v^2} + \frac{4}{1 + 4\omega_S^2 \tau_v^2} \right) \quad \text{Equation 1.14}$$

$$\left(\frac{1}{T_{2e}}\right)^{ZFS} = C \left(3\tau_v + \frac{5}{1 + \omega_S^2 \tau_v^2} + \frac{2}{1 + 4\omega_S^2 \tau_v^2} + 3 \right) \quad \text{Equation 1.15}$$

$$C = \frac{1}{50} \Delta^2 \tau_v \{4S(S + 1) - 3\} \quad \text{Equation 1.16}$$

Où Δ^2 est le carré de la fluctuation moyenne du ZFS (en s⁻²) et τ_v est le temps de corrélation pour la modulation du ZFS.

Quatre paramètres clés jouent un rôle particulièrement important et peuvent être modulés en fonction de la structure du complexe (Figure 1.8)⁹:

- Le nombre d'hydratation q correspond au nombre de molécule d'eau directement liée au métal. Le nombre de molécule d'eau q est proportionnel à r_1^{1S} (équation 1.5) ce qui signifie qu'en augmentant q on augmente r_1^{1S} . Ce paramètre est modulable expérimentalement. En effet, il faut sélectionner des ligands dont la denticité est plus faible que le nombre de coordination du métal. Cependant, cela conduit aussi à diminuer la stabilité thermodynamique et cinétique du complexe et complique donc le développement d'agent de contraste polyhydratés.³³
- La distance métal-proton r_H est au dénominateur et à la puissance 6 dans l'équation 1.6. Ainsi, une faible augmentation de cette distance contribue à une grande baisse de la relaxivité, d'où l'importance d'une interaction entre le métal et la molécule d'eau. Expérimentalement, il est difficile de déterminer r_H et il s'agit pour la majorité d'estimation à partir de la distance entre le métal et l'oxygène. Cette méthode est approximative car l'angle entre le métal et la liaison oxygène-hydrogène est difficile à déterminer en solution.⁹
- Le temps de résidence des protons τ_m est un paramètre important dans l'augmentation de la relaxivité. Plus il sera court, plus les protons du solvant subiront l'effet paramagnétique du métal. Deux mécanismes sont possibles pour l'échange de protons. Le premier est un échange prototropique et le second un échange de la molécule d'eau elle-même. A un pH neutre, on a généralement un échange de molécule d'eau intacte avec le solvant car la vitesse d'échange de ces deux mécanismes est similaire. Lorsqu'on augmente la basicité ou l'acidité, on observe que la vitesse d'échange prototropique est supérieure à la vitesse d'échange des molécules d'eau du fait des mécanismes acides ou basiques pouvant avoir lieu à ces pH.³⁴ La charge du complexe peut aussi influencer la vitesse d'échange d'eau et cet effet est dépendant du mécanisme d'échange. En effet, pour un complexe chargé négativement et dans le cas d'un mécanisme dissociatif d'échange d'eau, la molécule d'eau aura un temps de résidence plus court qu'un complexe neutre ou cationique.³⁵ De plus, le temps de résidence dépendra aussi de l'encombrement stérique au niveau du site de fixation et de la rigidité du complexe.^{36,37}
- Le temps de corrélation rotationnel τ_r est un des paramètres déterminant le temps de temps de corrélation global τ_{ci} (Equation 1.12). Plus le temps de corrélation rotationnel

τ_r sera grand, plus le temps de corrélation global sera élevé. À des champs magnétiques élevés (> 10 MHz), le temps de corrélation rotationnel τ_r est généralement le facteur limitant de la relaxivité pour des structures de petits poids moléculaires. Afin d'augmenter la relaxivité il est ainsi possible d'augmenter la taille des structures en y ajoutant des interactions covalentes ou intermoléculaire avec des substituants macromoléculaires (protéines, oligosaccharides, dendrimères, micelles...).³⁸

La contribution des sphères secondaires et externes à la relaxivité n'est pas négligeable. En effet, en prenant pour exemple le complexe Gd-**1**³⁹, le complexe a une relaxivité proche de $2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 60 MHz pour un nombre d'hydratation de $q = 0$. Cette relaxivité est donc à attribuer aux protons des sphères externes (Figure 1.9).

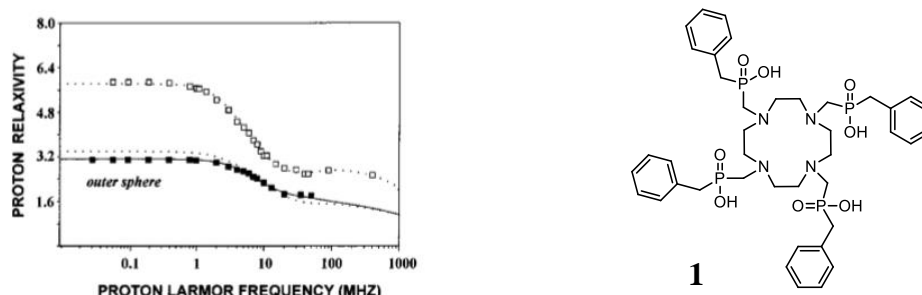


Figure 1.9 : Structure du ligand **1** et Profil NMRD du complexe Gd-**1** à 25 °C (carrés noir) avec sa courbe d'ajustement (ligne noir). La ligne pointillée correspond à la contribution théorique de la sphère externe. La seconde courbe (carrés blanc) n'est pas discutée³⁹.

Une autre étude a permis de déterminer la distance métal-proton $r_{\text{Gd-H}}$ entre la molécule d'eau de la seconde sphère de coordination et Gd^{3+} en comparant les profils de relaxivité des complexes $[\text{Gd}(\text{DOTP})]^{5-}$ et $[\text{Gd}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^{-}$.⁴¹ A 25 °C, la relaxivité du complexe $[\text{Gd}(\text{DOTP})]^{5-}$ est inférieure à celle de son analogue tétracarboxylate (Figure 1.10). Ces données s'expliquent par l'absence de molécules d'eau dans la sphère interne de coordination et en considérant une seconde sphère de coordination due aux groupements phosphonates. Un très bon ajustement des données expérimentales a pu être obtenu avec deux molécules d'eau à une distance $r_{\text{Gd-H}}$ de 3,89 Å. Ce résultat étant plus cohérent avec les données structurales de complexes similaires. À titre de comparaison, une analyse des données avec la théorie SBM et

$q = 1$ donne une distance métal-protons de r_{Gd-H} de 3,26 Å, distance trop importante ($r_{Gd-H} \approx 3.1$ Å).⁴⁰

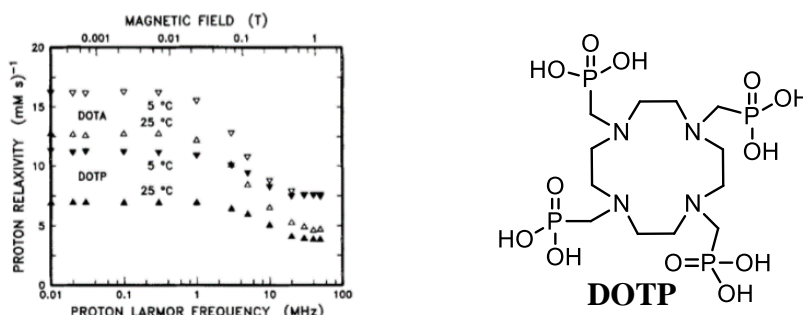


Figure 1.10 : Structure du ligand **DOTP** Profils NMRD du complexe *Gd-DOTP* à 5 °C (▼) 25 °C (▲), comparé aux profils NMRD du *Gd-DOTA* à 5 °C (▼) 25 °C (▲).⁴¹

b. Détermination des paramètres de la théorie SBM.

Dans le but d'identifier les différents mécanismes d'interaction et processus dynamiques qui régissent la relaxation, le profil NMRD (« Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion ») d'un complexe est très souvent étudié. Il s'agit d'un graphique présentant la relaxivité d'un complexe paramagnétique en fonction du champ magnétique B_0 (Figure 1.11). Il permet de déterminer, après un ajustement mathématique des données expérimentales, certains paramètres décrits dans les équations 1.5 à 1.16. Le principal problème de cette technique est le nombre élevé de variables qui influencent le profil NMRD. En effet, dans un système simple où la seconde sphère peut être négligée et où la sphère externe peut être estimée, la théorie SBM de la sphère interne contient encore de nombreux paramètres à ajuster (τ_m , τ_r , Δ^2 et r_H). Afin d'avoir une interprétation précise du profil NMRD, il est nécessaire d'utiliser une autre technique indépendante qui permettra d'analyser simultanément les données des deux techniques et d'obtenir des paramètres ajustés avec précision.

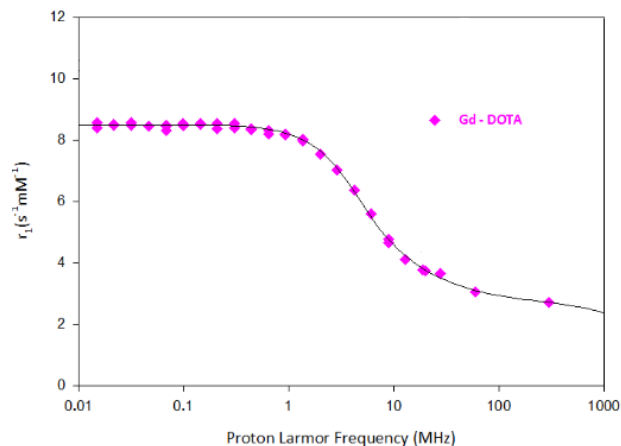


Figure 1.11 : Profil NMRD du GdDOTA à 37 °C.

Une des techniques qui permet de compléter la relaxométrie consiste à mesurer la vitesse de relaxation transversale et le déplacement chimique de l'oxygène 17 d'une solution paramagnétique et d'une solution de référence diamagnétique en faisant varier la température (Figure 1.12).

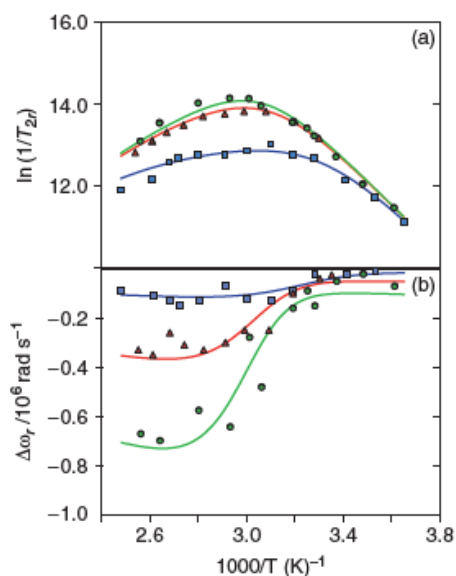


Figure 1.12 : Vitesse de relaxation transversale réduite et déplacement chimique de ^{17}O en fonction de la température du Gd-DTPA-BMA à trois champs magnétiques $B_0 = 9,4 \text{ T}$ (cercles vert), $4,7 \text{ T}$ (triangles rouge) et $1,4 \text{ T}$ (carrés bleu).⁴²

Ces deux données permettent ensuite de déterminer la vitesse de relaxation réduite et le déplacement chimique réduit de l'oxygène 17 grâce aux équations de Swift et Connick (Equation 1.17 et 1.18) :

$$\frac{1}{T_{2r}} = \frac{1}{P_m} \left[\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_{2A}} \right] = \frac{1}{\tau_m} \frac{T_{2m}^{-2} + \tau_m^{-1} T_{2m}^{-1} + \Delta\omega_m^2}{\tau_m (\tau_m^{-1} + T_{2m}^{-1})^2 + \Delta\omega_m^2} + \frac{1}{T_{2OS}} \quad \text{Equation 1.17}$$

$$\Delta\omega_r = \frac{1}{P_m} [\omega - \omega_A] = \frac{\Delta\omega_m}{(1 + \tau_m T_{2m}^{-1})^2 + \tau_m^2 \Delta\omega_m^2} + \Delta\omega_{OS} \quad \text{Equation 1.18}$$

Avec :

- $1/T_{2r}$, la vitesse de relaxation transversale réduite de ^{17}O de la solution paramagnétique.
- $\Delta\omega_r$, le déplacement chimique réduit de ^{17}O de la solution paramagnétique.
- $\Delta\omega_m$, le déplacement chimique réduit de ^{17}O lié au métal.
- $\Delta\omega_{OS}$, le déplacement chimique de ^{17}O de la sphère externe.
- $1/T_{2OS}$, la vitesse de relaxation transversale de ^{17}O de la sphère externe.
- $1/T_{2A}$ et $1/T_2$, respectivement, les vitesses de relaxation transversales de ^{17}O de la référence diamagnétique et de la solution paramagnétique.
- ω_A et ω , respectivement, les déplacements chimiques de ^{17}O de la référence diamagnétique et de la solution paramagnétique.
- τ_m , le temps de résidence de la molécule d'eau.
- T_{2m} , le temps de relaxation transversal de la molécule d'eau liée au métal.

Le déplacement chimique de ^{17}O lié au métal $\Delta\omega_m$ est proportionnel à la constante de couplage scalaire A_O/\hbar selon l'équation 1.19 :

$$\Delta\omega_m = \frac{g_L \mu_B S(S+1) B A_O}{3 k_B T \hbar} \quad \text{Equation 1.19}$$

Avec B, les champs magnétiques, S, le nombre de spin, g_L , le facteur de Landé g isotropique, μ_B , le magnéton de Bohr, k_B , la constante de Boltzmann ($=1,380\ 649 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$) et T, la température.

Les mesures de la relaxation transversale et du déplacement chimique de ^{17}O sont réalisées dans les conditions où la théorie SBM est valide (jusqu'à 5 T). Comme l'oxygène de la molécule d'eau est directement lié au métal, la contribution scalaire à la relaxation transversale est dominante, il est alors possible d'écrire que (d'après l'équation 1.9 et 1.13) :

$$\frac{1}{T_{2m}} \cong \frac{1}{T_2^{SC}} = \frac{S(S+1)}{3} \left(\frac{A}{\hbar} \right)^2 \left(\frac{\tau_{e2}}{1 + \omega_S^2 \tau_{e2}^2} + \tau_{e1} \right) \quad \text{Equation 1.20}$$

$$\frac{1}{\tau_{ei}} = \frac{1}{\tau_m} + \frac{1}{T_{ie}} \quad (i = 1, 2) \quad \text{Equation 1.21}$$

L'inverse du temps de résidence τ_m correspond à la vitesse d'échange k_{ex} avec les molécules d'eau et est exprimé par l'équation 1.22:

$$\begin{aligned} k_{ex} = \frac{1}{\tau_m} &\cong \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT}\right) \\ &= \frac{k_{ex}^{298} T}{298,15} \exp\left[\frac{\Delta H^\ddagger}{R} \left(\frac{1}{298,15} - \frac{1}{T}\right)\right] \end{aligned} \quad \text{Equation 1.20}$$

Avec ΔS^\ddagger et ΔH^\ddagger , respectivement, l'entropie et l'enthalpie d'activation du processus d'échange et k_{ex}^{298} , la vitesse d'échange de la molécule d'eau à 298,15 K. Les mesures de la relaxation transversale et du déplacement chimique permettent donc de déterminer un certain nombre de paramètres influençant la relaxivité. Ces paramètres sont k_{ex} , ΔS^\ddagger , ΔH^\ddagger , A_0/\hbar , ainsi que τ_v et Δ^2 , les paramètres qui gouvernent le temps de relaxation électronique T_{ie} (équation 1.15 et 1.16)

1.2. La Tomographie à Emission de Positron.

1.2.1. Généralités.

La tomographie à émission de positron (TEP) est une technique d'imagerie qui permet de visualiser la distribution tridimensionnelle de la radioactivité suite à l'injection d'un radiotracer émetteur de positron. C'est une technique de très grande sensibilité, pour laquelle le radiotracer est injecté à des concentrations de l'ordre du nano- voire picomolaire. La TEP permet d'observer l'activité métabolique des organes et de détecter d'éventuelles anomalies. Elle est notamment utilisée en cancérologie, en neurologie et en cardiologie.

Le développement de la TEP et de la médecine nucléaire en général est intimement lié à la l'histoire de la radioactivité découverte par Henri Becquerel en 1896 et dont la connaissance fut amplifiée par les travaux de Pierre et Marie Curie dans les années 1960.

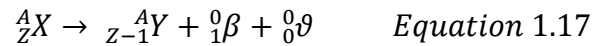
En 1912, George de Hevesy fut le premier à utiliser des éléments radioactifs comme traceurs afin de suivre l'évolution chimique du plomb. Grâce à la découverte de la radioactivité artificielle en 1934 par Irène et Frédéric Joliot-Curie, il était alors possible d'envisager la production d'isotopes radioactifs d'éléments jouant un rôle essentiel pour le domaine biomédical. Ainsi, en 1935, les premiers travaux étudiant des indicateurs radioactifs d'éléments physiologiques spécifiques (phosphore, sodium...) chez l'animal virent le jour.

Afin d'améliorer les techniques de détection, de nombreux travaux pour le développement de détecteurs ont été réalisés. En 1970, le premier tomographe est installé par G. Hounsfield et la société EMI et c'est finalement en 1976 à l'Université de Pennsylvanie que le premier examen TEP est réalisé en utilisant un tomographe monophotonique et le traceur FDG marqué au fluor 18.⁴³

Depuis, l'utilisation de la TEP s'est largement démocratisée et le développement de scanners combinant la TEP avec la tomodensitométrie (TDM, une technique d'imagerie) a été un véritable tremplin à son développement en permettant l'acquisition simultanée d'images anatomiques (TDM) et fonctionnelles (TEP).⁴⁴

1.2.2. Principe de la TEP

La tomographie à émission de positrons repose sur l'utilisation d'isotopes radioactifs émetteurs de positrons. Ces derniers se désintègrent vers un état stable par la transformation d'un proton en neutron et par l'émission d'un positron (${}^0_1\beta$) et d'un neutrino (ϑ) non détecté (Equation 1.17).



Lorsqu'il est émis, le positron parcourt quelques millimètres dans les tissus et perd son énergie cinétique. Une fois à l'arrêt, le positron interagit avec un électron et il y a annihilation des deux particules. La masse des particules est alors convertie en énergie et deux photons γ de 511 keV sont finalement émis dans des directions opposées.

Les deux photons γ sont détectés par des caméras γ et permettent de déterminer le point d'annihilation (et non le lieu de l'émission du positron). La distance entre le point d'émission et le point d'annihilation est appelée le libre parcours moyen. Il dépend de l'énergie du positron émis qui varie en fonction des radioisotopes. Plus l'énergie du positron sera grande plus le libre parcours moyen sera important. Il s'agit donc d'une première limitation de la TEP en termes de résolution spatiale. Une autre limitation est la non-colinéarité des photons γ dû à une annihilation ayant lieu avant que le positron perde toute son énergie cinétique. Ce défaut de colinéarité est de l'ordre de $0,5^\circ$ (Figure 1.14).⁴⁵

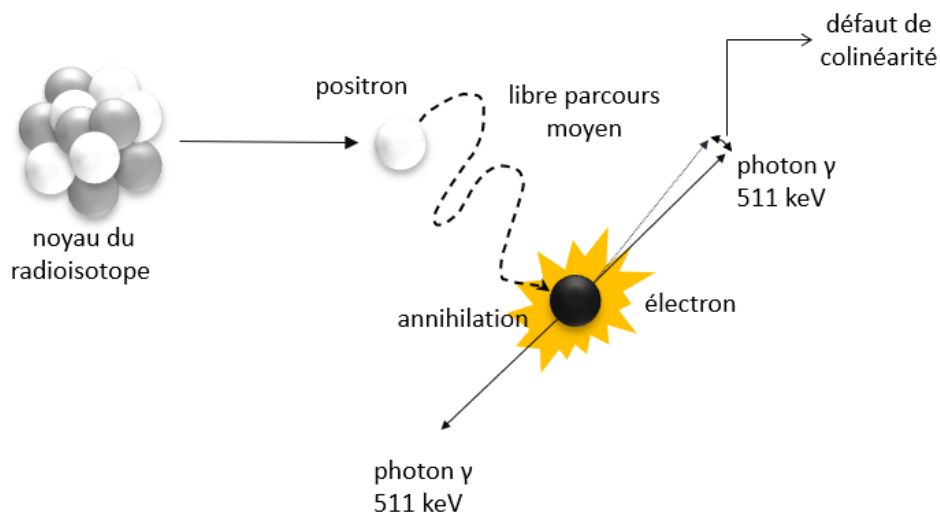


Figure 1.14 : Désintégration du radioisotope, annihilation et émission des deux photons γ .

Les appareils TEP sont constitués d'une série de couronnes de détecteurs qui sont réparties en anneaux autour du patient. Chaque détecteur est composé d'un ou plusieurs cristaux scintillateurs et d'un ou plusieurs photomultiplicateurs (Figure 1.15). Lorsque les photons γ sont détectés, le circuit électronique du détecteur détermine le point d'annihilation sous deux conditions. La première est que les deux photons soient captés dans un délai inférieur à 10 ns. La seconde est que l'énergie de ces deux photons soit proche de 511 keV. Le traitement des données permet finalement de reconstruire l'image du point d'annihilation (Figure 1.15).⁴⁵

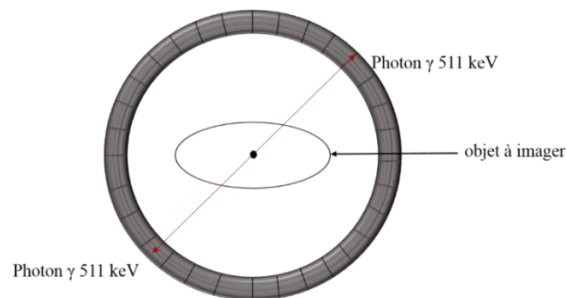


Figure 1.15 : Couronne de détecteurs γ et point d'annihilation.

La TEP dépend de l'accessibilité des radioisotopes. Ils sont produits généralement dans un cyclotron. Le cyclotron est un accélérateur de particules. Il est composé d'une chambre à vide formée de deux cavités semi-cylindriques appelées « dees » et séparées par un intervalle. Au centre, un émetteur de particules libère une particule chargée tels que les protons (p), les deutons (d) et les particules alpha (α). Sous l'influence d'un champ magnétique cette particule décrit un mouvement circulaire. Les « dees » ne sont pas au même potentiel, cela entraîne une accélération de la particule entre l'intervalle. L'augmentation de la vitesse conduit à l'augmentation du rayon de la trajectoire de la particule jusqu'à atteindre une limite lors de laquelle la particule est éjectée en direction de la cible (Figure 1.16). Tous les cyclotrons n'ont pas les mêmes caractéristiques en matière de faisceau, de cible d'énergie ou d'éléments produit. À titre d'exemple, Cyrcé, le cyclotron de l'IPHC à Strasbourg, est capable de fournir des particules avec des énergies allant de 16 à 25 MeV. Il est actuellement utilisé pour la production du fluor 18, du cuivre 64 et du zirconium 89 et utilise des cibles de Nickel 64 et d'Yttrium 89. Un autre exemple est le cyclotron du CEHMTI à Orléans qui est un cyclotron à énergie variable. Il est capable d'utiliser différents types de faisceaux tels que le faisceau de neutron (8 MeV), de proton, de deutéron, de ^3He et de particules alpha (10-45 MeV). Il a permis la production de nombreux isotopes comme le fluor 18, le cuivre 64, le carbone 11, l'astate 211 et le scandium 44.

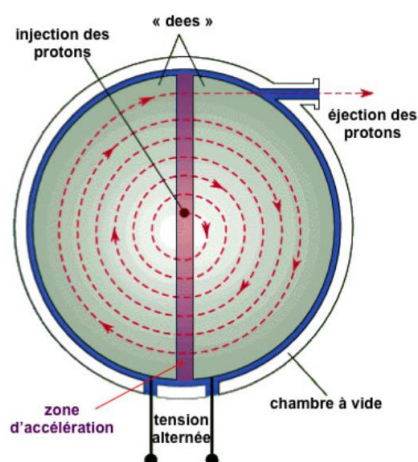


Figure 1.16 : Principe du cyclotron.⁴⁶

1.2.3. L'avantage des radionucléides à long temps de demi-vie pour l'immunoTEP.

Chaque radioisotope est caractérisé par son temps de demi-vie, l'énergie du positron émis et son pourcentage de désintégration β^+ . Les premiers radioisotopes utilisés étaient les éléments ^{11}C , ^{13}N et ^{15}O qui sont les principaux constituants des biomolécules. Le principal problème des radioisotopes ^{11}C , ^{13}N et ^{15}O est leur temps de demi-vie très court de 20 min, 10 min, et 2 min respectivement,⁴⁷ ce qui oblige d'avoir une infrastructure de production proche des appareils TEP. Actuellement, le radiotracer le plus utilisé en analyse de routine est le 2- ^{18}F fluoro-2-déoxy-D-glucose (^{18}F -FDG). Le fluor 18 possède un temps de demi-vie de 109 minutes, une énergie β^+ faible (0,654 MeV) et un pourcentage de désintégration β^+ de 97 %. Sa faible énergie signifie que son libre parcours moyen est faible, se traduisant ainsi par des images avec des résolutions particulièrement élevées. Le ^{18}F -FDG peut être obtenu par fluoration nucléophile ou électrophile (Figure 1.17).

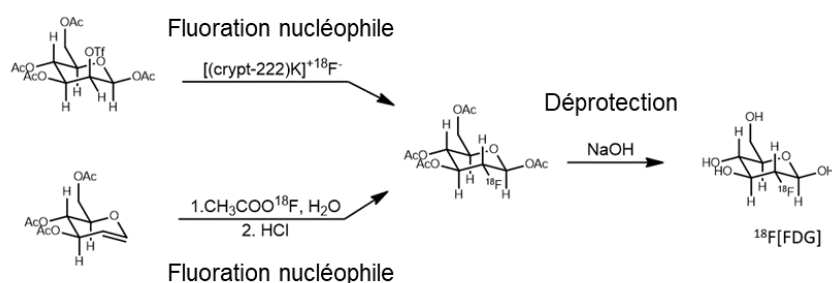


Figure 1.17 : Synthèse du ^{18}F -FDG

Depuis des dizaines d'années l'immunoTEP suscite un intérêt croissant. Cette technique consiste à combiner le ciblage spécifique des anticorps avec la haute sensibilité de la TEP afin de développer des sondes capables de cibler des antigènes spécifiques d'une pathologie ou d'observer des processus biologiques. Du fait de la taille des anticorps et de leurs interactions, leur élimination et leur accumulation au niveau de la cible sont lentes, ce qui nécessite l'utilisation de radionucléides à long temps de demi-vie (Tableau 1.3).⁴⁸ En plus de permettre le diagnostic, certaines sondes peuvent aussi être appliquées en thérapie dans le cadre de la radioimmunothérapie (RIT) avec des émetteurs β^- , plus énergétiques et avec un parcours moyen plus grand, correspondant au diamètre de plusieurs cellules ou amas cellulaires. La RIT est une radiothérapie vectorisée qui place la source directement au contact des cellules tumorales et permet ainsi de minimiser l'exposition des tissus sains aux rayonnements ionisants. En immunoTEP ou en RIT, les radioisotopes métalliques sont privilégiés. Ils sont complexés à un chélateur inerte auquel la biomolécule est conjuguée. Il faut s'assurer que cet adduit conserve la même affinité, la même stabilité et les mêmes caractéristiques pharmacocinétiques que la biomolécule seule. Bien que le fluor 18 soit un radioisotope de choix pour le TEP, son temps de demi-vie et ses conditions drastiques de radiomarquage sont difficilement compatibles avec l'immunoTEP. Le tableau 1.3 présente les radioisotopes les plus prometteurs pour l'immunoTEP.

Radioisotopes	Temps de demi-vie	Profile d'émission	Méthode de production
^{89}Zr	78,4 h	β^+ : 22,8 % ; $E_{\beta^+\text{max}}= 901 \text{ keV}$; EC : 77 % ; $E_{\gamma} = 909 \text{ keV}$	Cyclotron $^{89}\text{Y}(p,2n) \ ^{89}\text{Zr}$, $^{89}\text{Y}(d,n) \ ^{89}\text{Zr}$, $^{\text{nat}}\text{Sr}(\alpha, xn) \ ^{89}\text{Zr}$, etc
^{64}Cu	12,7 h	β^+ : 19 % ; $E_{\beta^+\text{max}}= 656 \text{ keV}$; EC : 41 % ; $E_{\gamma} = 1346 \text{ keV}$; β^- : 40 % ; $E_{\beta^-\text{max}}= 579 \text{ keV}$	$^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$; $^{64}\text{Ni}(d,2n)^{64}\text{Cu}$; $^{68}\text{Zn}(p, \alpha)^{64}\text{Cu}$
^{86}Y	14,7 h	β^+ : 34 % ; $E_{\beta^+\text{max}}= 3.15 \text{ MeV}$; EC : 66 % ; $E_{\gamma} = 1043 \text{ keV}$	Cyclotron

			$^{86}\text{Sr}(p,n)^{86}\text{Y}$; $^{86}\text{Sr}(d,2n)^{86}\text{Y}$
^{44}Sc	3,9 h	β^+ : 94 % ; $E_{\beta^+\text{max}} = 1474$ keV ; EC : 6% ; $E_\gamma = 1157$ keV	Générateur $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ Cyclotron $^{\text{nat}}\text{Ca}(p,n)^{44}\text{Sc}$; $^{44}\text{Ca}(p,n)^{44}\text{Sc}$
^{124}I	4.2 j	β^+ : 22 % ; $E_{\beta^+\text{max}} = 2,13$ MeV	Cyclotron $^{124}\text{Te}(p,n)^{124}\text{I}$
^{52}Mn	5,6 j	β^+ : 29,4 % ; $E_{\beta^+\text{max}} = 575$ keV ; $E_\gamma = 1434$ keV	Cyclotron $^{52}\text{Cr}(p,n)^{52}\text{Mn}$; $^{\text{nat}}\text{Cr}(p,x)^{52}\text{Mn}$

Tableau 1.3 : Radioisotopes à long temps de demi-vie et leurs caractéristiques.⁴³

Le zirconium 89 est intensément utilisé pour l'imagerie médicale car son énergie et son temps de demi-vie sont compatibles avec les temps de demi-vie des anticorps. Il est produit dans un cyclotron et différentes réactions nucléaires sont possibles (Tableau 1.3). Les voies les plus fréquentes sont celles à partir d'yttrium 89 du fait de sa disponibilité ($^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$). Le chélateur classique du zirconium est la desferrioxamine (DFO) (Figure 1.18). De nombreux dérivés ont été développés afin d'y ajouter un vecteur biologique pour l'immunoTEP. Cependant, le zirconium IV possède un nombre de coordination de huit qui n'est pas satisfait par les chélateurs de type hexadentates DFO.⁴⁹ Ce manque de donneurs est en partie responsable d'une faible stabilité conduisant à une accumulation de ^{89}Zr libre dans les os.⁵⁰ C'est pourquoi des dérivés ayant une denticité plus importante ont été développés. Parmi eux, les chélateurs DFO* et DFOcyclo*-pPhe-NCS (Figure 1.18) et leurs analogues bioconjugués ont montré une meilleure stabilité thermodynamique et moins d'accumulation de ^{89}Zr libre dans les os.⁵¹ Des recherches sont également menées en utilisant des plateformes plus rigides et préorganisées.⁵²

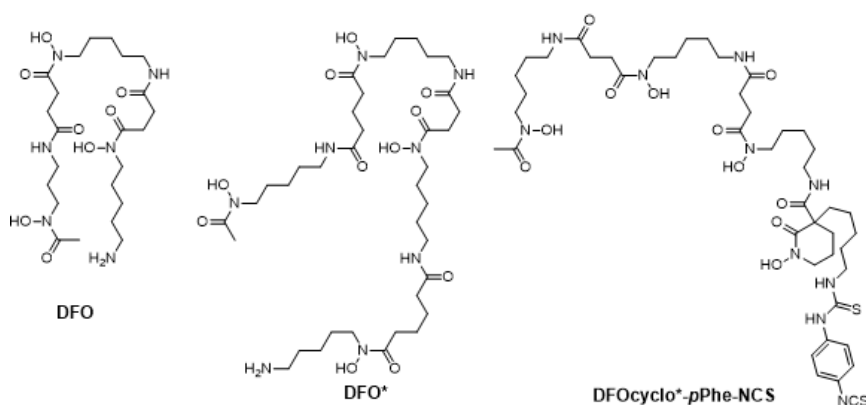


Figure 1.18 : Exemples de chélateurs du zirconium

Le cuivre 64 est un métal de choix pour l'immunoTEP du fait de son temps de demi-vie. Il est classiquement produit dans un cyclotron par bombardement d'une cible enrichie en nickel 64 selon la réaction $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$. En plus d'émettre des particules β^+ , ^{64}Cu émet aussi des particules β^- , il peut donc être utilisé à des fins théranostiques. De plus, un autre isotope du cuivre, le cuivre 67 émet des particules β^- à 100 %. Le couple $^{64}\text{Cu}/^{67}\text{Cu}$ présente ainsi un grand intérêt pour l'approche théranostique imagerie TEP/thérapie vectorisée. De nombreux ligands macrocycliques ont été étudiés pour la complexation du cuivre. Les dérivés du DOTA (Figure 1.19) sont les plus utilisés pour des applications en TEP. Cependant, il a été montré que les dérivés NOTA (Figure 1.19) étaient de meilleurs chélateurs pour l'immunoTEP. En effet, une étude comparant l'efficacité du DOTA et du NODAGA (Figure 1.19) comme chélateurs pour le radiomarquage par ^{64}Cu d'un anticorps, a montré que le NODAGA avait une meilleure stabilité *in vivo* et une plus faible accumulation de métal dans les organes.⁵⁴ Un autre dérivé du NOTA, le MANOTA a montré que ses bioconjugués ont de meilleures performances *in vivo* que le DOTA et le NODAGA en termes de stabilité et de bruit de fond.⁵⁵

La famille des cyclams a aussi été étudiée pour le développement de radiotraceurs pour l'immunoTEP. Le ligand CB-TE2A (Figure 1.19) est un bon chélateur pour le cuivre mais ses conditions de radiomarquage (95 °C, 60 min, pH 6-7)⁵⁶ ne lui permettent pas d'être appliqué en immunoTEP. Grâce au remplacement d'un des groupements carboxylates en groupement phosphonate, le ligand CB-TE1A1P (Figure 1.19) possède un bon rendement de radiomaquage à température ambiante. De plus, la présence du groupement carboxylate permet la bioconjugaison et a donc permis de réaliser des études en immunoTEP.⁵⁷ Un autre dérivé de la famille des cyclam, le ligand te1bpin (Figure 1.19), peut être utilisé pour l'immunoTEP grâce

au groupement phosphinate qui permet le développement de bioconjugués.⁵⁸ Le ligand TE1PA (Figure 1.19), un autre dérivé du cyclam, substitué par un groupement picolinate est aussi un bon candidat pour l'immunoTEP. En effet, ce dernier a montré une cinétique de complexation rapide, une bonne stabilité thermodynamique, une bonne inertie et une grande sélectivité à l'égard du cuivre(II).⁵⁹ Son analogue bifonctionnel *p*-SCN-Bn-TE1PA (Figure 1.19) a été bioconjugué avec l'anticorps de rat 9E7.4 (dirigé contre CD138, un antigène tumorale surexprimé dans différentes tumeurs) et radiomarké au cuivre 64. Une étude comparative avec les bioconjugués ⁶⁴Cu-9E7.4-*p*-SCN-Bn-NOTA (Figure 1.19) et ⁶⁴Cu-9E7.4-*p*-NHS-DOTA (Figure 1.19) a été réalisée et ⁶⁴Cu-*p*-SCN-Bn-TE1PA a montré une meilleur stabilité *in vivo* ainsi qu'une meilleur résistance à la transchélation que les dérivés du DOTA et du NOTA.⁶⁰

Les ligands de types diamsar sont aussi des ligands qui complexent le cuivre dans des conditions douces (20-37 °C, 5-30 min, pH 5-5.5). Son analogue bifonctionnel SarAr, a été utilisé pour des travaux en immunoTEP.⁶¹

La famille des bispidines (qui sera abordée en détail dans une prochaine partie) contient aussi de bons chélatants du cuivre, qui forme des complexes stables dans des conditions optimales. Singh et al. ont montré que les bispidines pouvaient être appliquées en immunoTEP. En effet, le ligand **6** (Figure 1.19) a été bioconjugué à un anticorps à domaine unique (sdAb), radiomarké au cuivre 64 et étudié en immunoTEP.⁶²

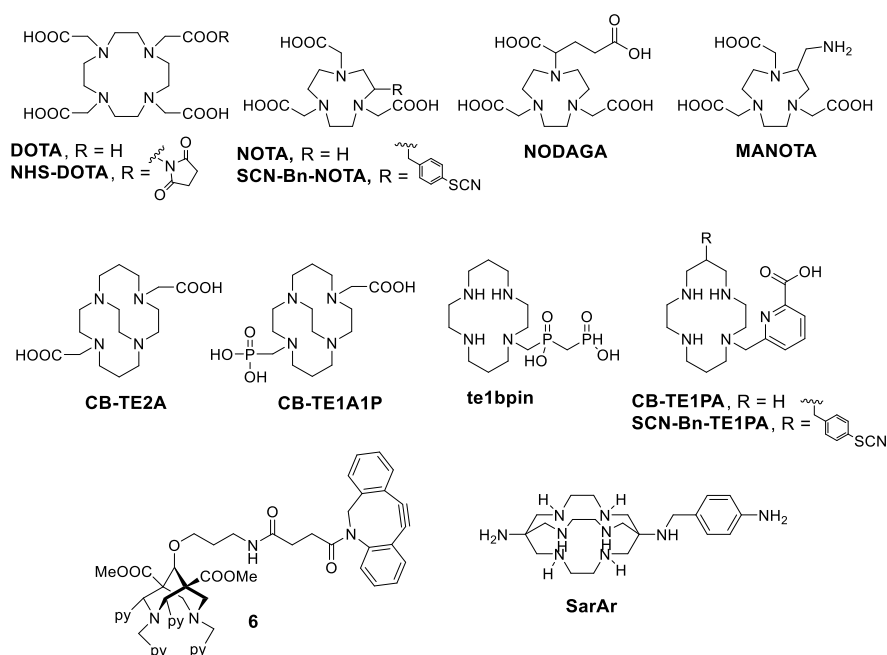


Figure 1.19 : Exemples de ligand du cuivre.

L'yttrium 86 possède un temps de demi-vie de 14,7 heures. Il est produit dans un cyclotron par bombardement d'un faisceau de protons sur une cible de strontium 86 d'après la réaction $^{86}\text{Sr}(p,n)^{86}\text{Y}$. Ici encore, l'intérêt principal de l'yttrium 86 vient de la grande popularité de l'isotope yttrium 90 (100 % émetteur β^-) pour la radiothérapie vectorisée.⁶³ Pour le radiomarquage d'anticorps avec ^{86}Y , les ligands les plus étudiés sont les dérivés de l'EDTA et du DTPA (Figure 1.20).⁶⁴ Afin d'augmenter la stabilité des complexes à base de DTPA, le ligand CHX-A-DTPA a été développé (Figure 1.20). L'ajout d'un groupement isothiocyanate a permis de bioconjuguer le ligand *p*-SCN-CHX-A-DTPA (Figure 1.20) à différents anticorps pour des études par ImmunoTEP.⁶⁵

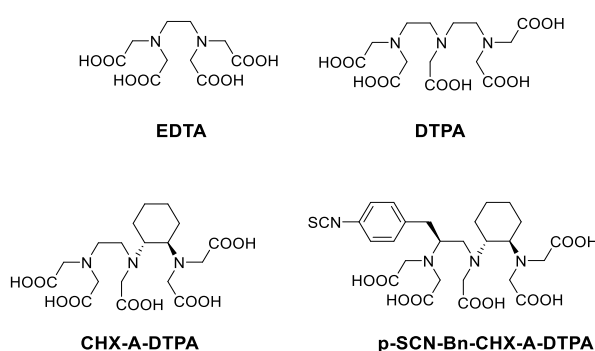


Figure 1.20 : Ligands de l'yttrium 89 pour l'immunoTEP.

Le scandium 44 possède un temps de demi-vie de 3,9 heures. Il est produit dans un cyclotron par bombardement d'un faisceau de proton sur une cible de calcium 44 d'après la réaction $^{nat}\text{Ca}(p,n)^{44}\text{Sc}$. Pour le moment seul, les ligands *p*-SCN-Bn-CHX-A-DTPA⁶⁶ (Figure 1.20) et H₄pypa-phényl-NCS⁶⁷ (Figure 1.21) ont été couplés à des anticorps et utilisés pour des études en immunoTEP. Récemment, un dérivé du NOTA, le H₃mpatcn (Figure 1.21), a aussi été utilisé pour la complexation du scandium. Le complexe formé a montré de bonnes propriétés en termes d'inertie cinétique. Le ligand a ensuite été fonctionnalisé avec le vecteur DUPA qui cible le PSMA (antigène membranaire spécifique de la prostate) surexprimé à la surface des tumeurs de la prostate. Ce bioconjugué a été radiomarqué au scandium 44 à température ambiante. Ces conditions font de ce ligand un candidat idéal pour des applications en immunoTEP.⁶⁸

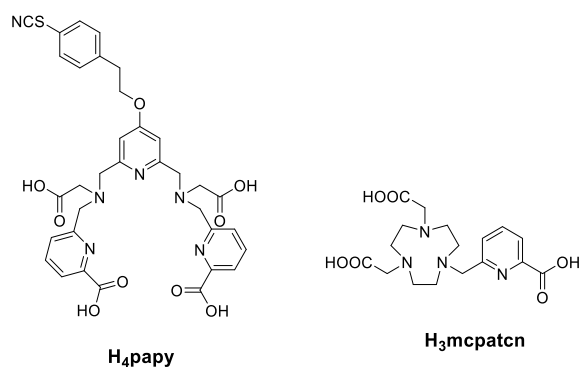


Figure 1.21 : Ligands du scandium pour l'immunoTEP

L'iode 124 a un temps de demi-vie très long de 4,2 jours. Il est produit dans un cyclotron à partir du tellure 124 d'après la réaction nucléaire $^{124}\text{Te}(p,n)^{124}\text{I}$. C'est un agent théranostique car en plus des positrons, il émet aussi des électrons Auger, capables de détruire les cellules cancéreuses. L'iode 124 a déjà été utilisé pour le radiomarquage de l'anticorps HMFGI en 1991.⁶⁹ Le radiomarquage par l'iode se fait majoritairement par la méthode IODO-GEN. Cette méthode consiste à utiliser le 1,3,4,6-tétrachloro-3 α ,6 α -diphényl glycoluril (ou Iodogen), un oxydant soluble en milieu aqueux. Il est dissous dans un solvant organique et est déposé sur les parois d'un tube en verre. La réaction est ensuite initiée par l'ajout de la protéine et de l'iodure de sodium dans une solution aqueuse. La réaction est arrêtée après un certain temps par le retrait du milieu réactionnel.⁷⁰

Le manganèse 52 a un long temps de demi-vie de 5,6 jours. Il est produit dans un cyclotron à partir de chrome 52 d'après la réaction nucléaire $^{52}\text{Cr}(p,n)^{52}\text{Mn}$ ou à partir de chrome naturel selon $^{nat}\text{Cr}(p,x)^{52}\text{Mn}$. Le manganèse 52 possède un pourcentage d'émission β^+ de 29,4 % et une énergie d'émission de 575 keV tandis que le zirconium 89 a un pourcentage d'émission plus faible et une énergie d'émission plus élevée (β^+ : 22,8 % ; $E_{\beta^+\text{max}} = 901$ keV). Ces données laissent penser que le manganèse 52 est un candidat prometteur pour la TEP. De plus le manganèse étant hautement paramagnétique, il est applicable en IRM. Il est donc envisageable de développer des sondes bimodales IRM/TEP. Pour cela, il est nécessaire de développer des ligands capables de former des complexes stables et inertes pour ces applications. La principale contrainte pour le développement de ce complexe étant la coordination de la molécule d'eau pour l'IRM, la prochaine partie présentera les travaux réalisés dans le but d'obtenir des agents de contraste à base de manganèse pour l'IRM et dont la stabilité et l'inertie sont des conditions toutes aussi importantes pour l'IRM que la TEP.

1.3. L'utilisation du Mn(II) pour l'imagerie bimodale TEP/IRM.

1.3.1. Avantage de la bimodalité.

L'imagerie bimodale est un concept qui est exploré depuis plus de 20 ans par l'imagerie TEP/CT (CT = Computational Tomography ou tomodensitométrie en français). Les informations structurales apportées par le scanner aux rayons X et les informations fonctionnelles apportées par le TEP font de cette technique un incontournable de l'imagerie médicale. L'imagerie TEP/CT est très utilisée en oncologie afin de déterminer, par exemple, le stade de la maladie mais aussi pour la mise en place du traitement approprié.⁷¹

A l'instar de cette technique, l'utilisation de l'imagerie bimodale TEP/IRM est progressivement en train de se démocratiser. Depuis 2010, les premiers scanners TEP/IRM pour l'homme ont été installés, dont une trentaine aux Etats-Unis et quatre en France. Ici encore, l'idée est de coupler la très haute sensibilité de la TEP à la très bonne résolution spatiale de l'IRM. L'intérêt croissant de l'imagerie TEP/IRM s'explique par les différents avantages qu'elle apporte par rapport à la TEP/CT. En effet, un des premiers avantages de l'IRM est qu'elle est non ionisante contrairement au scanner à rayon X. De plus, elle permet une excellente résolution temporelle sur les tissus mous tandis que le scanner est plus approprié pour les tissus peu hydratés tels que les os et les poumons. L'acquisition simultanée en TEP/IRM permet aussi une meilleure correction des mouvements pour le TEP ce qui conduit à une meilleure résolution et une meilleure quantification. Enfin, un dernier avantage est la réalisation de ces deux examens en un seul rendez-vous, entraînant ainsi un gain de temps et de ressource pour le patient et les hôpitaux.⁷²

De nombreuses études ont été réalisées afin de comparer le gain en performance de diagnostic de la TEP/IRM par rapport à la TEP/CT. En 2019, Morsing et al. ont présenté une étude rassemblant les différents travaux qui comparent la performance du diagnostic de l'imagerie TEP/IRM à celle de la TEP/CT dans différents cancers.⁷¹ L'étude a conclu que l'imagerie TEP/IRM permettait d'améliorer le diagnostic du cancer du nasopharynx et du cancer du sein. Par exemple, en 2018, Chan et al. ont investigué l'utilité clinique de l'imagerie TEP/IRM par rapport à la TEP/CT et l'IRM seul pour la détermination des stades du cancer chez des patients atteints d'un carcinome du nasopharynx (CNP). Cette étude a concerné 113 patients atteints d'un CNP et ayant reçu un prétraitement ainsi que des examens TEP/CT et TEP/IRM pour la détermination du stade du cancer. Les images obtenues ont ensuite été comparées

indépendamment. Premièrement, l'étude en TEP/IRM a permis de mieux localiser les extensions de la tumeur qu'en TEP/CT (14 patients détectés par TEP/IRM présentant une extension dans la fosse ptérygo-palatine contre 9 en TEP/CT, 25 patients contre 14 présentant une extension intracrânienne et 21 patients contre 7 présentant une infiltration peurineurale).

Ensuite, la TEP/IRM s'est montrée plus sensible dans la détection des tumeurs de classe N (c'est à dire présentant une extension de la tumeur dans les ganglions périphériques), que la TEP/CT et l'IRM (99,5 % contre 90,9 % et 94,2 % respectivement). Enfin, pour l'évaluation des métastases distantes, les trois techniques ont montré la même sensibilité (90 % pour TEP/IRM, 83 % pour la TEP/CT et 86,7 % pour l'IRM). Néanmoins, la TEP/IRM a donné une valeur prédictive positive (qui correspond à la probabilité d'une personne d'être réellement malade lorsque le dépistage est positif) plus grande qu'en TEP/CT et en IRM (93.1 % contre 83.1 % et 78.8% respectivement).⁷³

Pour le cancer du sein, une étude a été réalisée en 2015 afin de comparer l'utilisation de l'imagerie TEP/CT et TEP/IRM pour déterminer la présence de métastases osseuses issues du cancer du sein. Pour ce faire, 109 patients ayant subi un examen en TEP/CT et TEP/IRM ont été choisis. D'abord, sur les 109 patients, 25 présentaient des métastases osseuses. L'imagerie par TEP/CT a été capable de détecter la présence des métastases osseuses chez 22 patients sur 25 tandis qu'en TEP/IRM des métastases ont été détectées chez les 25 patients. De plus, 90 métastases osseuses ont été dénombrées avec la TEP/CT contre 141 avec la TEP/IRM, ce qui démontre bien la meilleure sensibilité de cette technique.⁷¹

Dans ce contexte, il est donc pertinent de se tourner vers l'utilisation de complexes de manganèse ($^{52}\text{Mn(II)}$ et $^{55}\text{Mn(II)}$) pour l'imagerie TEP/IRM). Les principaux ligands étudiés ainsi que leurs avantages et inconvénients respectifs sont présentés dans le paragraphe ci-dessous.

1.3.2. Cahier des charges et état de l'art des complexes de manganèse (II) pour l'IRM.

L'ion manganèse(II) a un rayon similaire à celui du calcium(II) et de ce fait, il possède une affinité avec ses sites de fixation. Cela induit une toxicité du manganèse(II) à de forte concentration ($LD_{50} = 0.22$ mmol/kg pour le rat). Chez l'homme, une surexposition peut entraîner le développement d'une maladie appelée manganisme, qui cause des troubles neurologiques similaires à la maladie de Parkinson.⁷⁴ Il est donc nécessaire de développer des ligands permettant la complexation du Mn^{2+} . Les challenges de cette chimie ainsi que les principaux édifices étudiés sont bien résumés dans les revues suivantes :[75], [76], [77].

La rigidité et la denticité des ligands jouent un rôle très important dans la stabilité des complexes. Le manganèse(II) possède habituellement un nombre de coordination de six ou sept. Néanmoins, pour le développement d'agent de contraste pour l'IRM, il est presque obligatoire de diminuer la denticité des ligands afin de permettre la complexation d'au moins une molécule d'eau. Cette nécessité entraîne cependant une diminution de la stabilité thermodynamique et de l'inertie cinétique qui sont des paramètres très importants afin d'éviter toute décomplexation, transmétallation ou transchélation en présence d'ions métalliques et de chélatants endogènes. Ces deux paramètres sont dépendants de la nature du métal. En effet, les complexes à base de manganèse(II) ont généralement une stabilité thermodynamique plus faible que les complexes de gadolinium(III) à cause d'une charge de l'ion métallique moins importante. De plus, les complexes de manganèse(II) sont aussi généralement moins stables que les autres complexes de métaux de transition car l'ion manganèse(II) se situe au début de la série d'Irving-Williams.

La difficulté est donc de trouver le bon équilibre afin d'obtenir des ligands qui permettront la complexation des molécules d'eau mais qui assureront aussi une bonne stabilité thermodynamique et cinétique. C'est dans cette optique que différents types de ligands ont été étudiés pour le développement d'agent de contraste à base de manganèse(II). Ils peuvent être divisés en deux grandes familles ; les ligands linéaires et les macrocycles.

A) Les ligands linéaires

Les premiers ligands étudiés sont les ligands dérivés de l'EDTA (Figure 1.22). Le ligand EDTA forme avec Mn^{2+} des complexes heptacoordonnés stables ($\log K_{MnL} = 13,88$, $pMn = 8,01$ avec $c_{MnL} = 10$ μ L à pH 7,4).⁷⁸ Le complexe contient une molécule d'eau et a une relaxivité de $3,3$ $mM^{-1} \cdot s^{-1}$ à 20 MHz et 25 °C. La vitesse d'échange avec les molécules d'eau étant rapide ($4,7 \cdot 10^8$

s^{-1}), il est possible d'augmenter la relaxivité en ajoutant des groupements qui vont contribuer à diminuer le temps de corrélation rotationnelle. Il est aussi possible d'ajouter des groupements permettant d'induire une interaction non covalente avec l'albumine sérique humaine (HSA) créant ainsi un édifice macromoléculaire avec une relaxivité plus élevés. Cet effet est particulièrement important aux champs moyens (20 à 200 MHz). En effet, Aime et al. ont montré qu'en ajoutant un ou deux groupements benzyloxyméthyl (connus pour former des adduits avec la HSA), la relaxivité (20 MHz, 25 °C) en présence d'HSA atteignait $55,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ avec $[\text{Mn}(\text{EDTA-BOM})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ (Figure 1.22) et $48 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ contre $[\text{Mn}(\text{EDTA-BOM}_2)(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ (Figure 1.22) contre $3,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $4,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, respectivement, sans HSA.⁷⁹ Un autre ligand qui présente aussi un groupement de ce type est le ligand EDTA-PCyPh₂⁸⁰ (Figure 1.22) avec une fonction diphénylcyclohexylphosphate. Cette fonction a déjà été utilisée pour l'agent de contraste MS-325, à base de gadolinium qui a été développé pour l'angiographie.⁸¹ Ainsi, l'ajout de cet agent a permis au complexe $[\text{Mn}(\text{EDTA-PCyPh}_2)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ d'atteindre une relaxivité de $48 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ en présence d'HSA contre $5,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ dans le tampon HEPES. Un autre dérivé de l'EDTA qui a été étudié pour le manganèse(II) est le ligand DEBPN (Figure 1.22) qui contient deux fonctions pyridines. Il forme un complexe heptacoordonné avec une molécule d'eau, d'après la structure déterminée par cristallographie au rayon X. La relaxivité de ce complexe est de $3,56 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ contre $1,76 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour l'EDTA à 128 MHz. Trois hypothèses ont été émises afin d'expliquer cet écart. La première est un mélange d'espèces avec une, deux, voire trois molécules d'eau (après décoordination des groupements esters) conduisant à une relaxivité moyenne plus élevée que le complexe avec l'EDTA. La deuxième hypothèse est une différence de vitesse d'échange de molécule d'eau entre $[\text{Mn}(\text{EDTA})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ et $[\text{Mn}(\text{DEBPN})(\text{H}_2\text{O})]$. La dernière hypothèse est une différence dans les sphères externes de coordination mais l'EDTA contient plus de groupements carboxylates que le DEBPN, ce qui devrait plutôt entraîner une baisse de la relaxivité et non l'augmentation observée.⁸²

Le ligand HBET a aussi été utilisé pour la coordination du manganèse(II). Il contient une fonction phénolate et a été étudié pour le développement de sonde redox. En effet, le ligand HBET forme des complexes stables avec Mn(II) et Mn(III). Le groupement phénolate favorise l'oxydation du manganèse(II) permettant ainsi de passer d'un complexe heptacoordonné avec une molécule d'eau et une relaxivité de $2,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à un complexe hexacoordonné sans molécule d'eau et une relaxivité de $1,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.⁸³ La diminution de la relaxivité s'explique par

la disparition de la molécule d'eau mais également une modification des propriétés électroniques ($S = 2$ et $T_{1e} \leq 10$ ps pour $Mn(III)^{HS}$ au lieu de $S = 5/2$, $T_{1e} = 0.1 - 1$ ns $Mn(II)^{HS}$).⁸³

Le principal inconvénient de l'EDTA et de ses dérivés est leur très faible inertie cinétique. En effet, dans des conditions physiologiques (pH 7,4, $1,10^{-5}$ M d'ion Cu^{2+}), le temps de demi-vie de $[Mn(EDTA)(H_2O)]^{2-}$ n'est que de 4,56 min. Ce manque d'inertie est principalement dû à la flexibilité du ligand et c'est pourquoi des analogues plus rigides ont été développés.

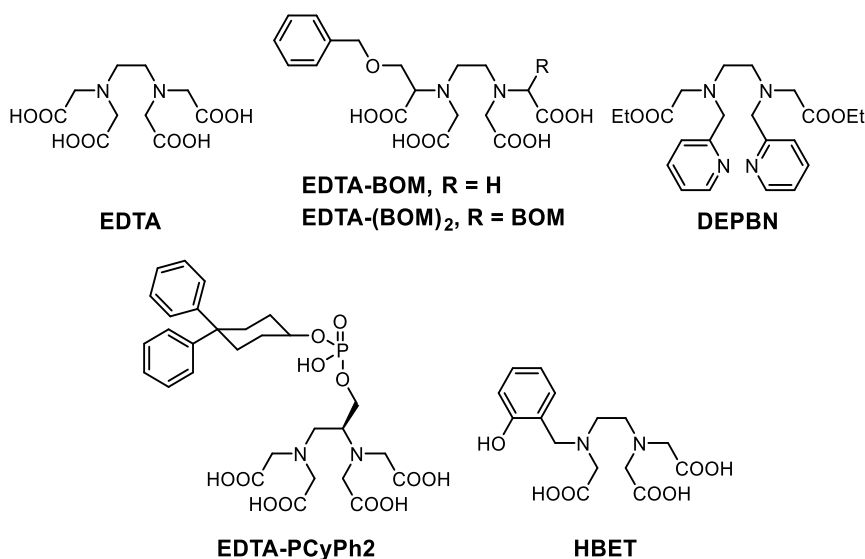


Figure 1.22 : Structures des ligands de type EDTA

Parmi eux, on retrouve le ligand 1,2-trans CDTA (Figure 1.23) où l'ajout du cycle permet d'augmenter la rigidité et de préorganiser la cavité. L'inertie cinétique entre le $[Mn(EDTA)(H_2O)]^{2-}$ et $[Mn(CDTA)(H_2O)]^{2-}$ est augmentée de 10^4 avec un temps de demi-vie passant de $7,6 \cdot 10^{-2}$ h à 12 h dans les mêmes conditions. La stabilité thermodynamique est aussi plus grande avec le CDTA qu'avec l'EDTA. En effet, le pMn ($\log([M^+])$, où $[M^+]$ est la concentration en métal libre à une condition donnée, ici pH = 7,4 ; $[Mn] = [L] = 10^{-5}$) est de 7,83 pour $[Mn(EDTA)(H_2O)]^{2-}$ et de 9,90 pour le $[Mn(CDTA)(H_2O)]^{2-}$.⁸⁴

Un des dérivés du CDTA est le CyHBET (Figure 1.23), qui, comme son analogue HBET, forme des complexes stables avec Mn(II) et Mn(III) et a été étudié comme potentielle sonde redox. Ici encore, une diminution de la relaxivité a été observée lors de l'oxydation du complexe Mn(II) en Mn(III) passant de $r_1 = 3,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ avec $[Mn^{II}(\text{CyHBET})(H_2O)]^{2-}$ à $r_1 = 0,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ avec $[Mn^{III}(\text{CyHBET})(H_2O)]^{2-}$. La stabilité thermodynamique n'est, dans ce cas, pas améliorée par l'ajout du cycle car le pMn de $[Mn(\text{HBET})(H_2O)]^{2-}$ était de 6,62 et celui de

$[\text{Mn}(\text{CyHBET})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ de 6,68 (pH 7,4 $[\text{M}^+] = [\text{L}] = 10^{-5}$ M). L'inertie cinétique n'a pas été étudiée.⁸³

Un des complexes les plus prometteurs pour le développement d'un agent de contraste à base de manganèse(II) est le $[\text{Mn}(\text{PyC3A})(\text{H}_2\text{O})]^-$ (Figure 1.23), un autre dérivé du CDTA où un des bras méthylencarboxylate est remplacé par un bras méthylenepyridyl. Ce dernier a montré une bonne stabilité thermodynamique avec un pMn de 8,2, proche de celui du CDTA. Il a aussi montré une inertie cinétique importante lors d'une étude de transmétallation en présence de 25 équivalents de zinc(II) où il était deux fois plus inerte que le $[\text{Mn}(\text{CDTA})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ et vingt fois plus inerte que le $[\text{Gd}(\text{DTPA})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$, l'agent de contraste Magnevist® commercialisé et utilisé en clinique jusqu'en 2017. La relaxivité de $[\text{Mn}(\text{PyC3A})(\text{H}_2\text{O})]^-$ est de $2,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (60 MHz, 25 °C), soit légèrement inférieure à la relaxivité des complexes $[\text{Mn}(\text{EDTA})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ et $[\text{Mn}(\text{CDTA})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ et la présence d'une molécule d'eau a été confirmée par l'étude de la RMN de l'oxygène 17 en fonction de la température.⁸⁵

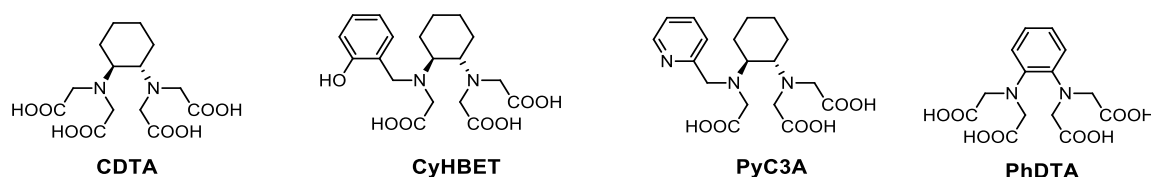


Figure 1.23 : Structures des ligands de types CDTA et du ligand PhDTA.

Différentes études IRM *in vivo* ont été réalisées avec ce complexe. La première a été réalisée sur des souris saines dans le but d'évaluer le gain de contraste, la biodistribution et l'élimination du composé. Les résultats ont montré que le complexe permettait l'augmentation du contraste (Figure 1.24), qu'il se diffusait bien dans les zones extracellulaires et qu'il était rapidement éliminé ($t_{1/2} = 7,8 \pm 3,0$ min) par les voies rénales et hépatiques.⁸⁵

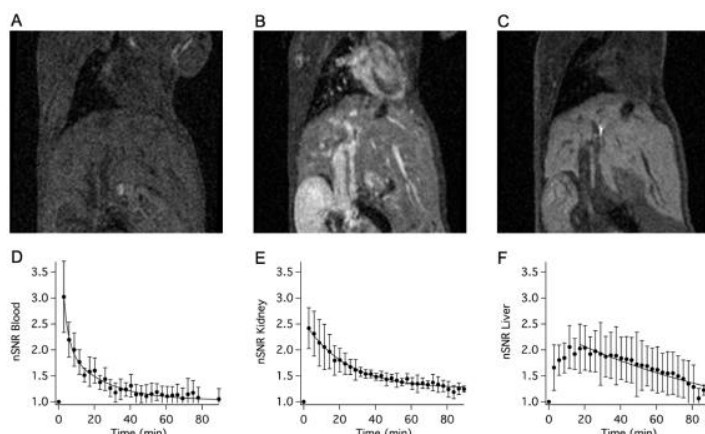


Figure 1.24 : Images IRM coronales pondérées en T_1 d'une souris de type balb/C avant (A) 3 min après (B) 25 min après (C) l'administration intraveineuse de $60 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ de $\text{Na}[\text{Mn}(\text{PyC3A})(\text{H}_2\text{O})]^-$. Rapport signal/bruit (nSNR) en fonction du temps dans le sang (D), les reins (E) et le foie (F) après injection de $\text{Na}[\text{Mn}(\text{PyC3A})(\text{H}_2\text{O})]^-$.⁸⁵

Après 24 h, l'ICP-MS a montré qu'il restait moins de 0,05 % de la dose injectée par gramme de tissu dans le foie et dans les reins. La deuxième étude *in vivo* a porté sur le développement d'un chélate bifonctionnel pour l'imagerie des thrombus (caillot de sang). Pour cela, le ligand PyC3A a été modifié en remplaçant le groupement pyridyl par un groupement picolinate ce qui a permis de fonctionnaliser la fonction carboxylate et d'ajouter ce chélate sur un peptide qui cible spécifiquement les fibrines (protéines polymériques insolubles issues du processus de coagulation) qui sont les principales constituantes des thrombus (Figure 1.25).

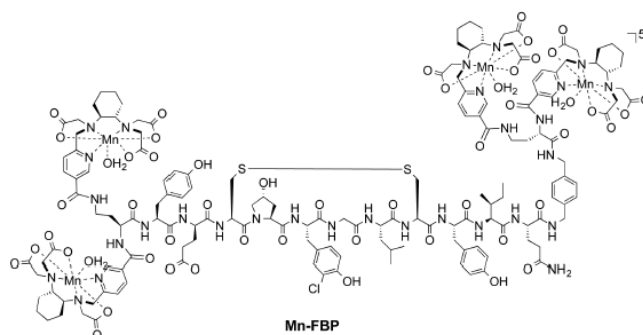


Figure 1.25 : Structure de la sonde bifonctionnelle Mn-FBP.⁸⁵

La relaxivité du tétramère était de $8,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, ce qui est beaucoup plus élevé que le monomère, du fait du gain de taille et donc d'une augmentation du temps de corrélation rotationnelle. L'étude a été réalisée sur des modèles murins de thrombose de l'artère carotide. Elle a montré que la sonde permettait d'augmenter spécifiquement le contraste des thrombus avec une augmentation de 80 % du ratio signal sur bruit (Figure 1.26).⁸⁵

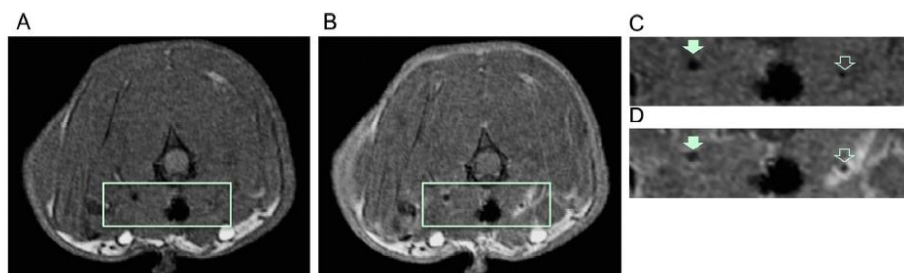


Figure 1.26 : Imagerie IRM moléculaire du thrombus de l'artère carotide commune dans un modèle de rat avec Mn-FBP. Images axiales pondérées en T1 avant (A, C) et 35 min après administration intraveineuse de Mn-FBP (B, D) à 1,5T. (C) et (D) sont des régions étendues de (A) et (B).⁸⁵

Une étude préclinique visant à comparer le gain de contraste intravasculaire chez des babouins entre $[\text{Mn}(\text{PyC3A})(\text{H}_2\text{O})]^-$ et $[\text{Gd}(\text{DTPA})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ a évalué l'excrétion, la pharmacocinétique et la métabolisation de $[\text{Mn}(\text{PyC3A})(\text{H}_2\text{O})]^-$. Les travaux ont montré que le $[\text{Mn}(\text{PyC3A})(\text{H}_2\text{O})]^-$ entraînait un gain de contraste similaire à $[\text{Gd}(\text{DTPA})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$. En effet, après injection, le ratio du contraste entre l'aorte et le muscle était de 476 ± 77 pour $[\text{Mn}(\text{PyC3A})(\text{H}_2\text{O})]^-$ et de 538 ± 120 pour $[\text{Gd}(\text{DTPA})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ et le ratio du contraste entre l'artère brachiocéphalique et le muscle de 524 ± 55 pour $[\text{Mn}(\text{PyC3A})(\text{H}_2\text{O})]^-$ contre 518 ± 140 pour $[\text{Gd}(\text{DTPA})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ (Figure 1.27). Ensuite, le complexe $[\text{Mn}(\text{PyC3A})(\text{H}_2\text{O})]^-$ a été rapidement éliminé par les voies rénales et hépatiques. Enfin, la métabolisation de $[\text{Mn}(\text{PyC3A})(\text{H}_2\text{O})]^-$ a été suivie par HPLC et elle a montré que le complexe restait intact après élimination.⁸⁶

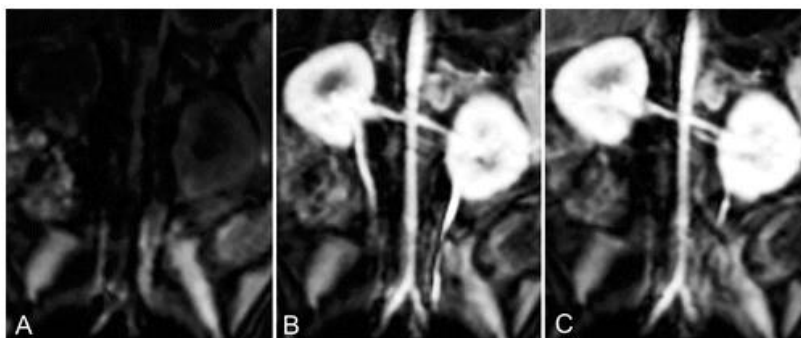


Figure 1.27 : Images coronales montrant l'aorte abdominale et les artères rénales pondérées en T_1 acquises à 3,0 T. (A) Avant l'injection d'agent de contraste, (B) 9 s après l'injection de 0,1 mmol / kg de $[Mn(PyC3A)(H_2O)]^-$ et (C) 9 s après l'injection de 0,1 mmol / kg de $[Gd(DTPA)(H_2O)]^{2-}$.⁸⁶

Une dernière étude a été réalisée sur des modèles murins de cancer du sein et de métastase du foie. Elle avait pour but d'évaluer l'efficacité de $[Mn(PyC3A)(H_2O)]^-$ par rapport à un agent de contraste commercial non spécifique, le $[Gd(DOTA)(H_2O)]^-$ et un agent de contraste commercial spécifique au foie, le $[Gd(EOB-DTPA)(H_2O)]^{2-}$, pour la détection de lésions cancéreuses et la quantification de l'excrétion, de l'élimination et de la biodistribution de $[Mn(PyC3A)(H_2O)]^-$. Les résultats ont montré que $[Mn(PyC3A)(H_2O)]^-$ augmentait le contraste des tumeurs aussi bien que le Gd-DOTA. En effet, 3 minutes après injection, l'augmentation du ratio du contraste entre la tumeur et le muscle était de $17 \pm 3,8$ pour $[Mn(PyC3A)(H_2O)]^-$ et de $20 \pm 4,4$ pour Gd-DOTA. L'imagerie du foie a montré qu'avec 0,1 mmol/kg de $[Mn(PyC3A)(H_2O)]^-$, il était possible de détecter les métastases du foie avec une sensibilité proche d'une dose clinique de $[Gd(EOB-DTPA)(H_2O)]^{2-}$ (0,025 mmol/kg pour la souris). Ainsi, 8 min post-injection l'augmentation du ratio du contraste entre la tumeur et le foie était de 28 ± 9 pour $[Mn(PyC3A)(H_2O)]^-$ et de 48 ± 23 pour $[Gd(EOB-DTPA)(H_2O)]^{2-}$.⁸⁷

Un autre analogue de l'EDTA est le PhDTA (Figure 1.23) qui est encore plus rigide que CDTA car il contient un cycle aromatique qui donne une géométrie plane aux liaisons C-N=N-C. Les études potentiométriques ont montré que le ligand PhDTA ($\Sigma \log K_i = 18,36$) était moins basique que l'EDTA ($\Sigma \log K_i = 21,28$) et que le 1,2-trans-CDTA ($\Sigma \log K_i = 22,99$) à cause du caractère électroattracteur du cycle aromatique. Cependant, le pMn (pH 7,4 $[M^+] = [L] = 10^{-5}$ M) de leur complexe est resté quasiment similaire (pMn(PhDTA) = 8,36). Enfin l'inertie cinétique de $[Mn(PhDTA)(H_2O)]^{2-}$ est meilleure que celle de Mn-EDTA et Mn-transCDTA car à pH physiologique son temps de demi-vie est de 19,1 h contre 0,076 h et 12,2 h pour Mn-EDTA et Mn-transCDTA respectivement. La relaxivité de $[Mn(PhDTA)(H_2O)]^{2-}$ est de $3,72 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (20

MHz, 25 °C) ce qui est similaire à celle du complexe de $[\text{Mn}(\text{EDTA})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ ($3,20 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) et $[\text{Mn}(\text{trans-CDTA})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ ($3,62 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).⁸⁸

Du fait de leur manque de stabilité, peu de ligands polyhydratés ont été étudiés pour l'IRM. Parmi eux, on retrouve les ligands de type H_2dpama (Figure 1.28). Constitués de deux groupements picolinates, ils forment des complexes pentacoordonnés, laissant deux sites de coordination vacants pour les molécules d'eau. Forgács et al. ont synthétisé le complexe $[\text{Mn}(\text{dpama})(\text{H}_2\text{O})_2]$ et mesuré une relaxivité de $5,32 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (à 60 MHz, 25 °C) ce qui est quasiment le double de la relaxivité des petits complexes de Mn(II) monohydratés.⁸⁹ Cependant, l'interaction du complexe avec la HSA n'a pas entraîné l'augmentation attendue de la relaxivité (de $r_1 = 4,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à $r_1^b = 12,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 20 MHz, 37 °C) bien que l'interaction entre le complexe et la protéine ait été confirmée par titration relaxométrique et par la formation d'un pic entre 8 et 60 MHz sur le profil NMRD de $[\text{Mn}(\text{dpama})(\text{H}_2\text{O})_2] + \text{HSA}$. Ceci est dû à une décoordination des molécules d'eau lors de l'interaction avec la protéine. Afin de corriger ce problème, une espèce dinucléaire ($\text{mX}(\text{H}_2\text{dpama})_2$) a été synthétisée (Figure 1.28). Ainsi, un des monomères pourra interagir avec la HSA, laissant le second intact avec ses deux molécules d'eau. La relaxivité du complexe $[\text{Mn}(\text{mX}(\text{dpama})(\text{H}_2\text{O})_2)_2]$ est alors de $6,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (20 MHz, 37 °C) dans l'eau et en présence d'HSA elle a atteint $39 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ dans les mêmes conditions, une augmentation bien plus importante qu'avec le complexe mononucléaire. Une espèce trinucléaire a aussi été synthétisée et ici encore la relaxivité de $[\text{mX}(\text{Mn}(\text{dpama})(\text{H}_2\text{O})_2)_3]$ (Figure 1.28) était plus élevée ($8,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 20 MHz, 37 °C) et l'interaction avec la HSA conduit à une grande augmentation de la relaxivité ($45 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 20 MHz, 37 °C).⁸⁹

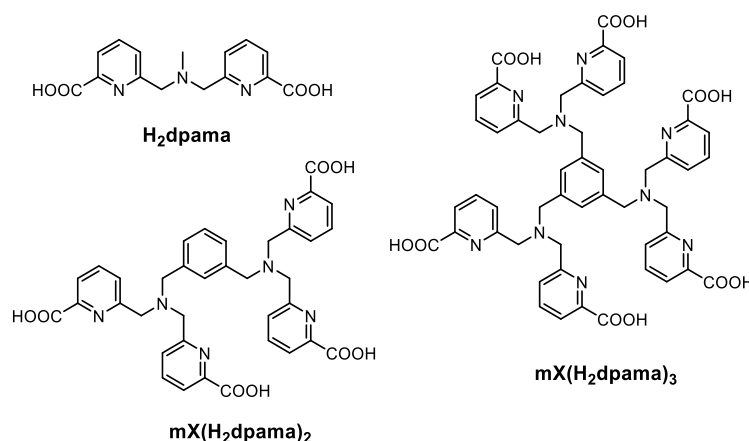


Figure 1.28 : Structure des ligands de type H_2dpama

Possédant un tout autre squelette, la famille des ligands AAZTA a aussi été investiguée pour la complexation du manganèse(II).⁹⁰ Le ligand AAZTA est déjà connu pour former des complexes stables avec le gadolinium(III).⁹¹ Ce ligand étant heptadentate, il a fallu développer des ligands de plus faible denticité afin de permettre la coordination d'une molécule d'eau pour les complexes de manganèse. Ainsi, les ligands AAZ3A, MeAAZ3A et AAZ3MA ont été synthétisés, la stabilité thermodynamique et la relaxivité des complexes de Mn(II) correspondants ont été déterminées. D'abord, les études potentiométriques ont montré que les trois ligands avaient la même basicité que AAZTA mais que les constantes de stabilité de leurs complexes de Mn^{2+} ($\log K_{MnL}(AAZ3A) = 11$, $\log K_{MnL}(MeAAZ3A) = 8,88$ et $\log K_{MnL}(AAZ3MA) = 8,72$) étaient plus faibles que celle de $[Mn(AAZTA)]^{2-}$ ($\log K_{MnL} = 15,44$). Les valeurs du pMn (pH 7,4, $[Mn^{2+}] = 10^{-6}$ M et $[L] = 10^{-5}$ M) des complexes Mn-AAZ3A (pMn = 9,1), Mn-MeAAZ3A (pMn = 8,88) et Mn-AAZ3MA (pMn = 8,72) sont aussi plus faibles que le pMn du complexe Mn-AAZTA (pMn = 12,53). Cette perte de stabilité est probablement due à une diminution des interactions électrostatiques du fait du retrait d'un groupement carboxylate. La relaxivité des complexes $[Mn(AAZ3A)(H_2O)]^-$, $[Mn(MeAAZ3A)(H_2O)]^-$ et $[Mn(AAZ3MA)(H_2O)]^-$ était de $2,49 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $2,01 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $1,90 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ respectivement contre $1,57 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour AAZTA. Bien que les relaxivités des trois complexes soient plus élevées, les valeurs sont trop faibles pour confirmer la présence d'une molécule d'eau. De plus, l'ajustement des données par la théorie de SBM qui a été réalisé avec cette hypothèse est irréaliste car il conduit à une distance Mn- H_{eau} (typiquement $2,81 \text{ \AA}$) trop grande ($> 3 \text{ \AA}$). Les données s'expliqueraient mieux en considérant une fraction de molécule d'eau et donc la présence d'un équilibre entre un complexe heptacoordonné avec $q = 1$ et un complexe hexacoordonné avec $q = 0$. Il a été considéré que pour chaque complexe la proportion entre ces deux complexes était différente. Ainsi, les pourcentages de complexe avec $q = 1$ qui ont été déterminés sont de 53 % pour $[Mn(AAZ3MA)(H_2O)]^-$, de 23 % pour $[Mn(MeAAZ3A)(H_2O)]^-$ et de 18 % pour $[Mn(AAZ3MA)(H_2O)]^-$.⁹⁰

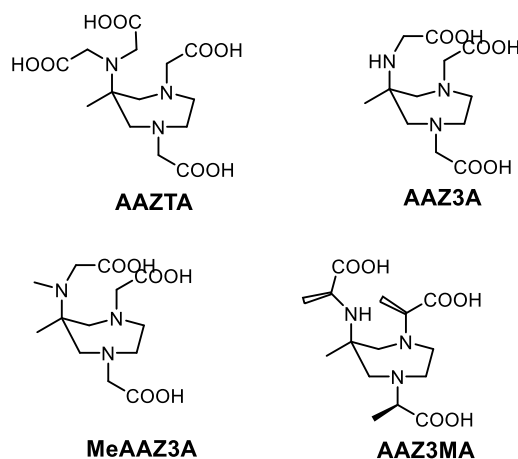


Figure 1.29 : Structures des ligands de type AAZTA

Récemment, un autre complexe de manganèse(II) a montré des caractéristiques intéressantes comme agent de contraste pour l'IRM. Le complexe MnL^{Me} (Figure 1.30), composé d'un ligand de type base de Schiff, est obtenu en seulement une étape après une réaction entre la 2,6-diacétylpyridine, l'acétylhydrazine et $MnCl_2$ dans le méthanol. L'inertie cinétique a été étudiée en présence de 25 équivalents de zinc(II) et pendant 60 jours, seuls des fluctuations négligeables ont été observés, ce qui traduit une très bonne inertie cinétique. La relaxivité du complexe est de $5,7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (20 MHz, 25 °C). L'étude par RMN de l'oxygène 17 et le profil NMRD ont permis de déduire la présence de deux molécules d'eau, d'où la très grande relaxivité observée. Une étude IRM *in vivo* a été menée chez la souris saine. Elle a montré que le complexe était éliminé par les voies rénales et hépatiques, que l'élimination dans les vaisseaux sanguins était retardée à cause des interactions avec les protéines du sérum et qu'après excrétion par la vessie, le complexe est resté intacte.⁹²

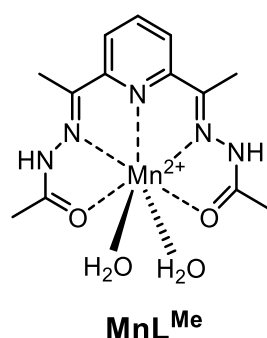


Figure 1.30 : Structure du complexe MnL^{Me}

B) Les ligands macrocycliques

Les ligands de type cyclen ont été investigués pour la complexation du manganèse. En effet, le DOTA forme des complexes stables ($\log K_{ML} = 19,89$ et $pMn = 8,94$) mais sans molécules d'eau.⁷⁷ C'est pourquoi Rolla et al. ont étudié par relaxométrie une série de ligands de type cyclen avec un (DO1A), deux (1,4-DO2A et 1,7-DO2A) et trois (DO3A) bras acétate (Figure 1.31).⁹³ Les résultats ont montré que le complexe $[Mn(DO1A)(H_2O)]^+$ contenait une molécule d'eau avec une relaxivité de $2,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (20 MHz, 25 °C) et que le complexe $[Mn(DO3A)]^-$ n'avait pas de molécule d'eau et donc une relaxivité plus faible de $1,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Les deux isomères $[Mn(1,4-DO2A)(H_2O)]$ et $[Mn(1,7-DO2A)]$ ont montré des relaxivités différentes. La raison de cette différence est que le complexe Mn-1,7-DO2A est hexacoordiné avec $q = 0$ et $r_1 = 1,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ tandis que le complexe $[Mn(1,4-DO2A)(H_2O)]$ est présent en solution sous la forme d'un mélange contenant 87 % d'un complexe heptacoordiné avec une molécule d'eau comme co-ligand et 13 % d'un complexe hexadentate sans molécule d'eau d'où une relaxivité moyenne de $2,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. La stabilité thermodynamique des complexes diminue avec la denticité des ligands. Ainsi pour $[Mn(DO3A)]^-$, son pMn (pH 7,4, $[Mn] = [L] = 10 \text{ } \mu\text{M}$) est proche de Mn-DOTA avec $pMn = 8,62$. $[Mn(1,7-DO2A)]$ et $[Mn(1,4-DO2A)(H_2O)]$ ont une stabilité thermodynamique plus faible avec un pMn de 6,61 et de 7,55 respectivement. La stabilité thermodynamique de $[Mn(DO1A)(H_2O)]^+$ n'a pas été étudiée. L'inertie cinétique de ces complexes a aussi diminué avec le nombre de donneur. En effet, à pH physiologique le temps de demi-vie de $[Mn(DOTA)]^{2-}$ était de 1060,9 h contre 48,3 h et 56,84 h pour $[Mn(1,4-DO2A)(H_2O)]$ et $[Mn(1,7-DO2A)]$ respectivement. L'inertie cinétique des complexes $[Mn(DO1A)(H_2O)]^+$ et $[Mn(DO3A)]^-$ n'a pas été étudiée.

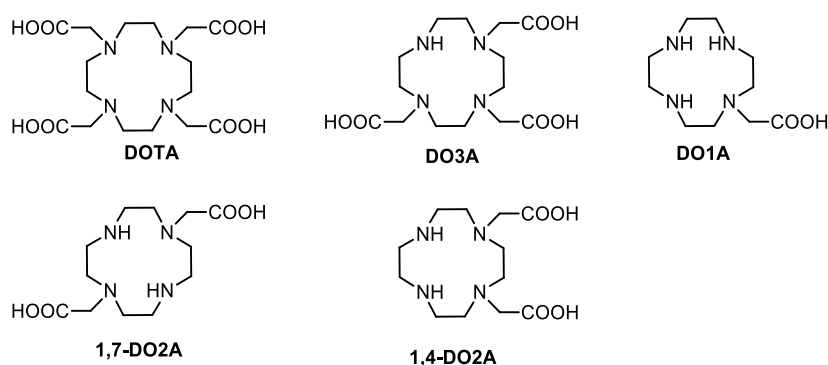


Figure 1.31 : Structure des ligands de type DOTA.

Dans le but d'améliorer l'inertie cinétique, les fonctions carboxylates du complexe $[\text{Mn}(1,4\text{-DO2A})(\text{H}_2\text{O})]$ ont été substituées par des fonctions amides.⁹⁴ Les études potentiométriques ont montré que le complexe Mn-1,4-DO2AM (Figure 1.32) avait une stabilité thermodynamique plus faible que le complexe $[\text{Mn}(1,4\text{-DO2A})(\text{H}_2\text{O})]$ avec $\log K_{\text{MnL}} = 12,64$ et $\log K_{\text{MnL}} = 15,22$ respectivement. Cependant, l'inertie cinétique du complexe $[\text{Mn}(1,4\text{-DO2AM})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ était plus élevée que celle de $[\text{Mn}(1,4\text{-DO2A})(\text{H}_2\text{O})]$ car à pH physiologique le temps de demi-vie de $[\text{Mn}(1,4\text{-DO2AM})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ était de 556 h contre 49,4 h pour de $[\text{Mn}(1,4\text{-DO2A})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$. La relaxivité reste quasiment similaire avec $r_1 = 2,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour $[\text{Mn}(1,4\text{-DO2AM})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ et $r_1 = 2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour $[\text{Mn}(1,4\text{-DO2A})(\text{H}_2\text{O})]$. Comme pour l'EDTA, le ligand 1,4-DO2AM a été modifié pour promouvoir une interaction avec la HSA. Dans ce cas, deux groupements benzyl ont été ajoutés sur deux positions différentes. La relaxivité de ces complexes était de $3,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $3,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour $[\text{Mn}(1,4\text{-BzDO2AM})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ et $[\text{Mn}(1,4\text{-DO2AMBz})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ respectivement (Figure 1.32). Ces relaxivités traduisent la présence d'une molécule d'eau dans la première sphère de coordination du métal. Grâce à la présence des groupements benzyl, ses composés forment des interactions hydrophobes avec la HSA pour former des adduits macromoléculaires. Cette interaction peut être quantifiée par la constante thermodynamique d'association K_A et le nombre de site indépendants n . Les constantes $n \cdot K_A$ qui caractérisent l'interaction avec la HSA sont beaucoup plus élevées avec les complexes $[\text{Mn}(1,4\text{-BzDO2AM})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ et $[\text{Mn}(1,4\text{-DO2AMBz})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ où $n \cdot K_A = 3909 \text{ M}^{-1}$ et $n \cdot K_A = 1964 \text{ M}^{-1}$ respectivement qu'avec $[\text{Mn}(1,4\text{-DO2A})(\text{H}_2\text{O})]$ où $n \cdot K_A = 1213 \text{ M}^{-1}$. Bien que la constante d'association de $[\text{Mn}(1,4\text{-BzDO2AM})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ soit deux fois supérieure à celle de $[\text{Mn}(1,4\text{-DO2AMBz})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$, la relaxivité de ce dernier en présence d'HSA est plus élevée ($r_1 = 27,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) que celle du complexe $[\text{Mn}(1,4\text{-BzDO2AM})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ ($r_1 = 18,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). L'hypothèse émise pour cette observation est que la présence des deux groupements hydrophobes sur les amides coordonnants limiterait les mouvements locaux au niveau de la sphère de coordination ce qui entrainerait un temps de corrélation rotationnelle plus long et augmenterait donc la relaxivité.

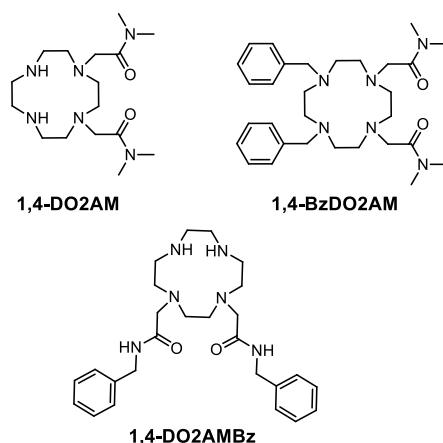


Figure 1.32 : Structures des ligands dérivés de 1,4-DO2A.

Du fait de leur grande stabilité avec différents métaux, le NOTA et ses dérivés (Figure 1.33) ont aussi été étudiés pour la complexation du manganèse(II). Comme pour le DOTA, le profil NMRD du complexe $[\text{Mn}(\text{NOTA})]^-$ a montré que le complexe ne possédait pas de molécule d'eau dans sa première sphère de coordination et que la relaxivité observée dépendait uniquement de la contribution des sphères secondaire et externe. Le ligand NOTA hexadentate, a été modifié afin de permettre la la coordination d'une molécule d'eau.⁹⁵ A titre d'exemple, on retrouve la synthèse d'un complexe dinucléaire avec le ligand ENOTA (Figure 1.33). Il s'agit de deux entités NOTA couplées par un pont éthyle. La présence de ce pont permet de laisser un site de coordination vacant pour la molécule d'eau. Les études potentiométriques ont montré que le complexe $[\text{Mn}_2(\text{ENOTA})(\text{H}_2\text{O})_2]$ avait un pMn (pH 7,4 ; $[\text{M}^+] = 1\text{mM}$, $[\text{L}] = 10\text{mM}$) de 7,7 contre 11,8 pour le $[\text{Mn}(\text{NOTA})]^-$. Cette perte de stabilité thermodynamique est notamment due au retrait d'un bras coordinant. La relaxivité de $[\text{Mn}_2(\text{ENOTA})(\text{H}_2\text{O})_2]$ est de $3,4\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ et montre la présence d'une molécule d'eau dans chaque complexe. Le profil NMRD a montré une seconde dispersion à bas champs qui traduisait d'après les analyses simultanées du profil NRMD et de la RMN de l'oxygène 17, un temps de relaxation électronique long (5,9 ns) et d'après l'analyse de la structure au rayon X, une distante Mn- H_{eau} plus courte (2,75 Å contre 2,9 Å avec les ligands de types EDTA).⁹⁶

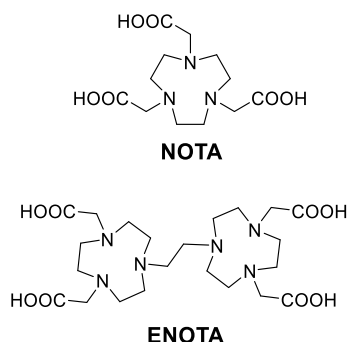


Figure 1.33 : Structures des ligands NOTA et ENOTA.

Les ligands de type 9ane-N₂O ont aussi été étudiés comme agent de contraste à base de manganèse(II). Ils sont dérivés du NOTA où un des azotes du macrocycle est substitué par un oxygène.

Quatre complexes ont été investigués (Figure 1.34) : ⁹⁷

- [Mn(9ane-N₂O-2A)(H₂O)] avec deux bras méthylencarboxylates
- [Mn(9ane-N₂O-2P)(H₂O)]²⁻ avec deux bras méthylenephosphonates
- [Mn(9ane-N₂O-2P^H)(H₂O)] avec deux bras méthylenephosphinates
- [Mn(9ane-N₂O-2P^{Ph})(H₂O)] avec deux bras méthylenephénylphosphinate

La stabilité thermodynamique de ces complexes est plus faible que les dérivés de type NOTA (pMn entre 6 et 6,34 contre 11,47 avec [Mn(NOTA)]⁻). L'ordre de stabilité de ces complexes est lié à la basicité des bras coordinants. Ainsi, le complexe le plus stable est [Mn(9ane-N₂O-2P)(H₂O)]²⁻ avec pMn = 6,34. Les complexes [Mn(9ane-N₂O-2P^H)(H₂O)] (pMn = 6,01) et [Mn(9ane-N₂O-2P^{Ph})(H₂O)] (pMn = 6,0) forment des complexes trop faibles pour permettre une complexation totale même avec un excès de ligand à pH 8. La transmétallation des complexes [Mn(9ane-N₂O-2A)(H₂O)] et [Mn(9ane-N₂O-2P)(H₂O)]²⁻ a été étudiée en présence de 5 équivalents de zinc(II). Cependant, leur décomplexation était trop rapide pour permettre le suivi par relaxométrie.

Le profil NMRD des quatre complexes a été mesuré. Les complexes [Mn(9ane-N₂O-2A)(H₂O)] et [Mn(9ane-N₂O-2P)(H₂O)]²⁻ présentent des profils communs aux complexes de faible poids moléculaire. Pour les complexes [Mn(9ane-N₂O-2P^H)(H₂O)] et [Mn(9ane-N₂O-2P^{Ph})(H₂O)], une seconde dispersion a été observée à bas champs du fait de la présence de manganèse libre.

La relaxation transversale et le déplacement chimique de l'oxygène 17 en fonction de la température ont aussi été étudiés. Leur analyse simultanée a permis de conclure sur la présence d'un équilibre entre un complexe monohydraté et bishydraté avec une vitesse d'échange très rapide ($k_{ex} = 1,2 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$) pour le complexe $[\text{Mn}(9\text{ane-N}_2\text{O-2A})(\text{H}_2\text{O})]$ et la présence d'une molécule d'eau et d'une vitesse d'échange plus lente ($k_{ex} = 1,2 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$) pour le complexe $[\text{Mn}(9\text{ane-N}_2\text{O-2P})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$. La relaxivité du complexe Mn-9ane-N₂O-2P est beaucoup plus grande que celle de $[\text{Mn}(9\text{ane-N}_2\text{O-2A})(\text{H}_2\text{O})]$ avec $r_1 = 5,08 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ contre $r_1 = 2,83 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (20 MHz, 25 °C) respectivement. Cette différence a été attribuée à un temps de corrélation rotationnel très long ($\tau_r = 103 \text{ ps}$) qui peut être dû à des interactions intermoléculaires causés par la présence des phosphonates.

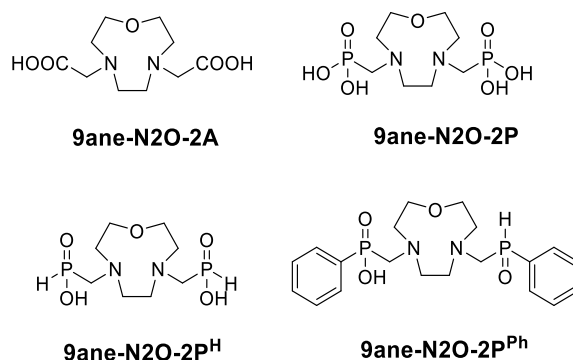


Figure 1.34 : Structures des ligands de type 9ane-N₂O.

Les ligands de type cyclen sont dérivés des cyclens. L'ajout d'une pyridine permet d'augmenter la rigidité du macrocycle. Ces derniers ont été utilisés pour complexer le manganèse (II).⁹⁸ Les premiers complexes de cette famille étudiés pour l'IRM étaient monosubstitués et composés d'un bras carboxylate $[\text{Mn}(\text{PCMA})(\text{H}_2\text{O})]^+$ et d'un bras phosphonate $[\text{Mn}(\text{PCMP})(\text{H}_2\text{O})]$. Les études potentiométriques ont montré que ces complexes avaient une stabilité thermodynamique modérée avec $\log K_{\text{ML}} = 11,54$ et $14,06$ pour $[\text{Mn}(\text{PCMA})(\text{H}_2\text{O})]^+$ et $[\text{Mn}(\text{PCMP})(\text{H}_2\text{O})]$ respectivement. Cependant, elles restent plus faibles que celles des macrocycles de type PCTA, DOTA et NOTA. Bien que le complexe $[\text{Mn}(\text{PCMP})(\text{H}_2\text{O})]$ ait une stabilité thermodynamique plus élevée que $[\text{Mn}(\text{PCMA})(\text{H}_2\text{O})]^+$, son inertie cinétique est plus faible. En effet, l'étude de transmétallation à pH 7,4 et en présence de zinc(II) en concentration physiologique a montré que $[\text{Mn}(\text{PCMP})(\text{H}_2\text{O})]$ se dissociait trop rapidement pour permettre le suivi alors que $[\text{Mn}(\text{PCMA})(\text{H}_2\text{O})]^+$ avait un temps de demi-vie de 144 min.

La relaxométrie des deux complexes a été investiguée par NMRD et RMN de l'oxygène 17. La mesure de la relaxation transversale de l'oxygène 17 en fonction de la température a permis de déterminer que la vitesse d'échange des complexes était très rapide pour Mn-PCMA et Mn-PCMP avec $k_{ex} = 3,04 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ et $2,84 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ respectivement. Les déplacements chimiques de l'oxygène 17 sont proportionnels aux nombres de molécule d'eau q et à la constante de couplage scalaire A_0/\hbar . Ainsi, en fixant $q = 1$, les valeurs de A_0/\hbar étaient de $39,9 \times 10^6$ et de $36,6 \times 10^6 \text{ rad.s}^{-1}$ respectivement. Elles sont donc en accord avec les valeurs des autres complexes de manganèse et permettent de confirmer que $q = 1$. Les profils NMRD sont typiques des complexes de Mn(II). Les relaxivités des complexes $[\text{Mn}(\text{PCMA})(\text{H}_2\text{O})]^+$ et $[\text{Mn}(\text{PCMP})(\text{H}_2\text{O})]$ sont de $2,39 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $2,84 \text{ mM} \cdot \text{s}^{-1}$ respectivement, ce qui est assez faible pour des complexes avec $q = 1$.

Le complexe $[\text{Mn}(\text{HPC2A-EA})]^+$ est présenté comme un potentiel candidat pour le développement d'un agent de contraste pH-répondant.⁹⁹ Le ligand PC2A-EA est trisubstitué avec deux bras méthylencarboxylate et une fonction éthylamine. La stabilité thermodynamique de ce complexe est plus grande que celle de Mn-PC2A ($\text{pMn} = 8,64$) ce qui montre que la fonction éthylamine joue un rôle dans la stabilité du complexe. La valeur du pMn ($[\text{M}^+] = [\text{L}]$, $\text{pH} 7,4$) de ce complexe est de 9,27, ce qui est plus élevée que celui du MnDOTA ($\text{pMn} = 8,94$).⁷⁷

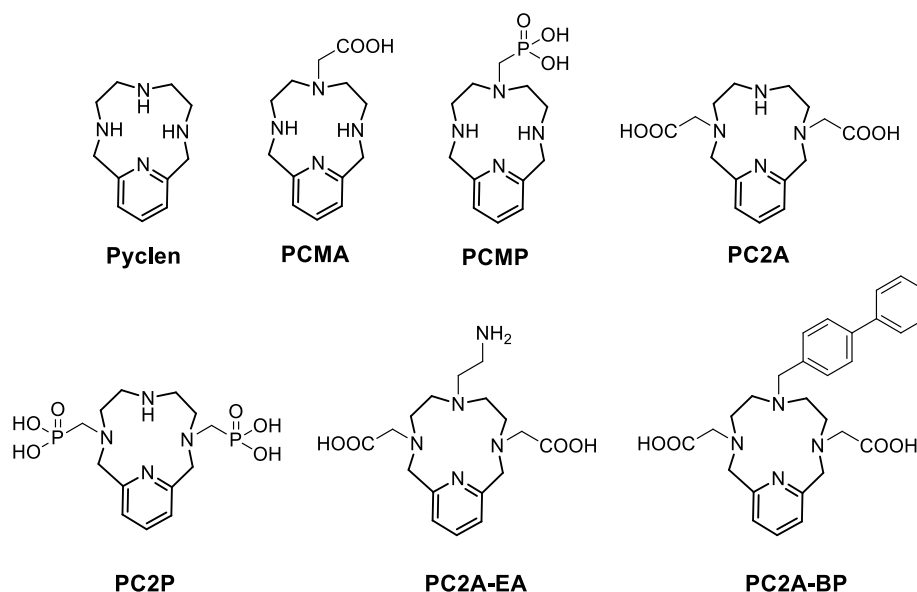


Figure 1.35 Structures des ligands de type pyclen.

L'inertie cinétique du complexe a été étudiée par deux études. La première est réalisée en présence de différentes concentrations de cuivre(II) et des valeurs de pH entre 2,2 et 3,4. La constante k_{obs} , (qui caractérise la transmétallation), était proportionnelle à la concentration en ions H^+ et était indépendante de la concentration en cuivre(II), ce qui indique que le mécanisme de décomplexation est proton-assisté. La seconde étude a été réalisée en présence d'un excès de Zn^{2+} à pH 6. Le temps-de demi-vie de ce complexe est de 54,4 heures ce qui est beaucoup plus élevé que $[Mn(PyC3A)(H_2O)]^-$ dans les mêmes conditions ($t_{1/2} = 0,29$ h).

La relaxivité de ce complexe est dépendante du pH. En effet, entre pH 3,7 et 5,8 la relaxivité du complexe est de $3,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $q = 1$. A un pH supérieur à 5,8, la relaxivité est de $2,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $q = 0$. Cette variation traduit la déprotonation de l'amine et sa coordination au manganèse. L'étude RMN de l'oxygène 17 du complexe a permis de conclure à une vitesse d'échange des molécules d'eau de $4 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, ce qui est dans le même ordre de grandeur que les autres petits complexes de manganèse.

L'image IRM du complexe dans le sérum a été réalisée à différent pH et à 1, 1,5 et 3 T. Les images montrent que l'intensité du signal varie bien en fonction du pH et qu'il est ainsi possible de suivre et de visualiser ces variations avec des appareils commerciaux.

Comme pour les dérivés EDTA, le ligand PC2A-BP (Figure 1.35) a été développé afin de permettre une interaction forte avec les protéines du sérum grâce à la présence d'une fonction bi-phényle.¹⁰⁰ Ainsi, le complexe $[Mn(PC2A-BP)(H_2O)]$ est présenté comme un candidat pour l'imagerie vasculaire. Il présente une stabilité thermodynamique ($pMn = 8,64$) quasiment identique à celle de Mn-PC2A ($pMn = 8,64$). L'inertie cinétique s'est avérée être aussi très bonne avec un temps de demi-vie de 286,2 h (pH 7,4, 25 °C). En comparaison, le temps de demi-vie du complexe Mn-PC2A était de 21 h. Cette différence s'explique par l'absence d'un mécanisme de décomplexation métallo-assisté pour le complexe Mn-PC2A-BP qui est présent dans le cas de Mn-PC2A. Le complexe $[Mn(PC2A-BP)(H_2O)]$ est cependant moins inerte que son analogue avec PC2A-EA où $t_{1/2} = 8 \times 10^3$ h dans les mêmes conditions. La relaxivité du complexe $[Mn(PC2A-BP)(H_2O)]$ dans l'eau est de $4,96 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et en présence de HSA elle atteint $23,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, ce qui confirme l'interaction avec la HSA. L'efficacité du complexe $[Mn(PC2A-BP)(H_2O)]$ comme agent de contraste pour l'angio-IRM a été évaluée chez la souris et l'étude a montré que le complexe permettait d'augmenter l'intensité du signal et d'améliorer la visualisation cérébrale à une dose quatre fois inférieure à la dose standard.

Les ligands 15pyN₃O₂ et 15pyN₅ (Figure 1.36), des macrocycles à 15 liaisons, ont aussi été étudiés pour le développement d'agent de contraste à base de manganèse(II).¹⁰¹ Le pMn des complexes [Mn(15pyN₃O₂)(H₂O)₂]²⁺ et [Mn(15pyN₅)(H₂O)₂]²⁺ est de 5,28 et 6,37 respectivement. La différence de stabilité des deux complexes est due à la présence des oxygènes à la place des azotes dans le macrocycle qui diminue la basicité du ligand. La stabilité thermodynamique de ces complexes est plus faible que celle des complexes composés de ligands de plus petite taille.

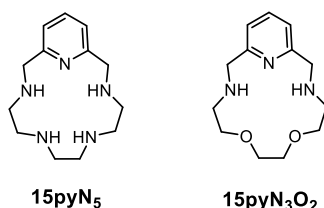


Figure 1.36 : Structures des ligands 15pyN₅ et 15 pyN₃O₂.

L'inertie cinétique des complexes a été investiguée en présence d'un excès de zinc(II) et à différents pH. Le complexe [Mn(15pyN₃O₂)(H₂O)₂]²⁺ n'a pas pu être étudié à un pH inférieur à 6 du fait d'une transmétallation trop rapide. Pour [Mn(15pyN₅)(H₂O)₂]²⁺, un temps demi-vie de 27 min a été mesuré (pH 6, 50 éq. de Zn²⁺).

Les valeurs de relaxivité de [Mn(15pyN₃O₂)(H₂O)₂]²⁺ et [Mn(15pyN₅)(H₂O)₂]²⁺ sont de 4,48 mM⁻¹.s⁻¹ et 3,56 mM⁻¹.s⁻¹ respectivement. L'analyse simultanée des données de la RMN de l'oxygène 17 et des données NMRD permettent d'établir la présence de deux molécules dans la première sphère de coordination pour chacun des complexes ainsi qu'une vitesse d'échange de 0,38.10⁷ s⁻¹ et 6,9x10⁷ s⁻¹ pour [Mn(15pyN₃O₂)(H₂O)₂]²⁺ et [Mn(15pyN₅)(H₂O)₂]²⁺ respectivement.

Le complexe [Mn(15pyN₃O₂)(H₂O)₂]²⁺ a une vitesse d'échange très faible et vingt fois inférieure à celle de [Mn(15pyN₅)(H₂O)₂]²⁺. Cette différence pourrait être due à la formation de liaisons hydrogène entre la molécule d'eau liée au métal et les atomes d'oxygène du macrocycle, ce qui ne serait pas le cas avec les atomes d'azote.

En conclusion de cette partie, les squelettes permettant d'atteindre simultanément des valeurs de relaxivités élevées, une grande inertie cinétique et une vitesse d'échange de l'eau rapide sont encore peu nombreux. Cette thèse a donc pour objectif d'évaluer le potentiel d'une nouvelle

famille de ligands, les bispidines. Leurs principales caractéristiques sont présentées dans le paragraphe suivant.

2. Les bispidines : Structure rigide et préorganisée.

2.1. Généralités.

Les bispidines appartiennent aux composés de type 3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonane. Cette structure est présente dans la spartéine, un produit naturel étudié pour ses propriétés anti-arythmiques par von Stenhouse en 1851.¹⁰² La synthèse des bispidines a été décrite pour la première fois par Mannich en 1930. Elles ont été obtenues par deux doubles réactions de Mannich.¹⁰³ La synthèse des bispidines substituées en position 2 et 4 (numérotation ci-après en figure 1.38) par des groupements aryles a été décrite pour la première fois par les groupes de Haller¹⁰⁴ et Caujolle.¹⁰⁵ Elles ont joué un rôle majeur dans l'accroissement de l'intérêt pour ce composé. En effet, dans les années 1990, Borsodi et al. ont montré que ces bispidines, et particulièrement HZ1 et HZ2, avaient une forte affinité et une forte sélectivité pour les récepteurs kappa des opiacés (Figure 1.37).^{106, 107} Au même moment, le groupe de Peter Comba a montré que la bispidine substituée en position 2 et 4 était un ligand idéal pour la complexation d'un grand nombre de métaux de transition et qu'il était possible de jouer sur le nombre de donneur en ajoutant des fonctions coordinantes sur les positions R₁ et R₂.¹⁰⁸

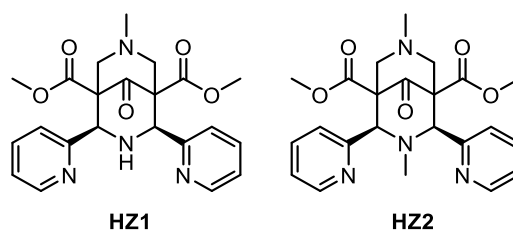


Figure 1.37 : Structure de HZ1 et HZ2.

La numérotation IUPAC du cycle est présentée Figure 1.38. Les bispidines contenant un groupement cétone et alcools en position 9 sont appelées bispidone et bispidol respectivement. Généralement, les fonctions R3 et R4 sont des groupements esters issus de la synthèse du précurseur et les groupements aryles sont des hétérocycles tels que des pyridines, des picolinates et des quinoléines.¹⁰⁹ Les travaux de cette thèse se focaliseront sur les bispidines substituées en position 2 et 4 par des groupements pyridines.

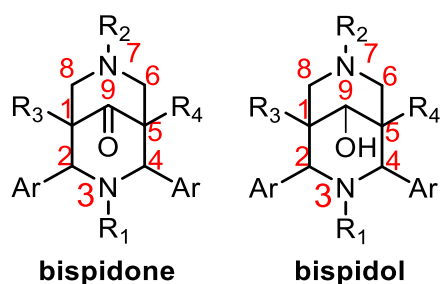


Figure 1.38 : Structures et numérotation de la bispidone du bispidol.

Comme précisé précédemment, les bispidines sont obtenues en deux étapes par deux doubles réactions de Mannich. La première étape est la synthèse du précurseur pipéridone qui est obtenu après une réaction entre la diméthyl-1,3-acétonedicarboxylate, la pyridinecarboxaldéhyde et une amine primaire (Figure 1.39).

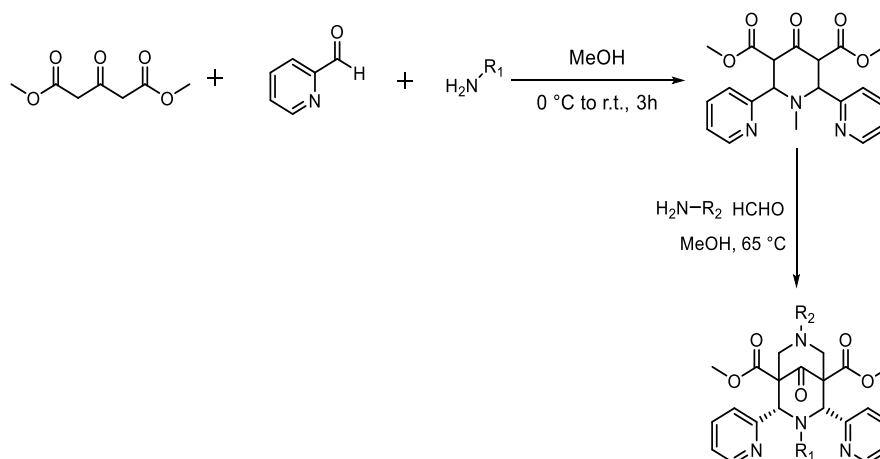


Figure 1.39 : Voie de synthèse classique des bispidines.

Le précurseur peut être obtenu sous différentes conformations. En effet, les pyridines peuvent adopter une conformation *cis* ou *trans* dont la proportion dépend de la taille du groupement en R_1 . De plus, l'équilibre céto-énolique de la cétone double le nombre de possibilité et quatre conformères peuvent être observés ; les conformations *trans*-énol, *cis*-énol, *trans*-cétone et *cis*-cétone (Figure 1.40, a). Le mélange obtenu est utilisé sans purification préalable pour la prochaine étape. La seconde étape consiste en une seconde réaction de Mannich entre le précurseur pipéridone, le formaldéhyde et une amine primaire (Figure 1.39). La bispidine formée peut alors adopter trois conformations différentes qui sont les conformations chaise-chaise, bateau-chaise et chaise-bateau (Figure 1.40, b). La conformation bateau-bateau n'est pas observée car elle est peu favorable énergétiquement.

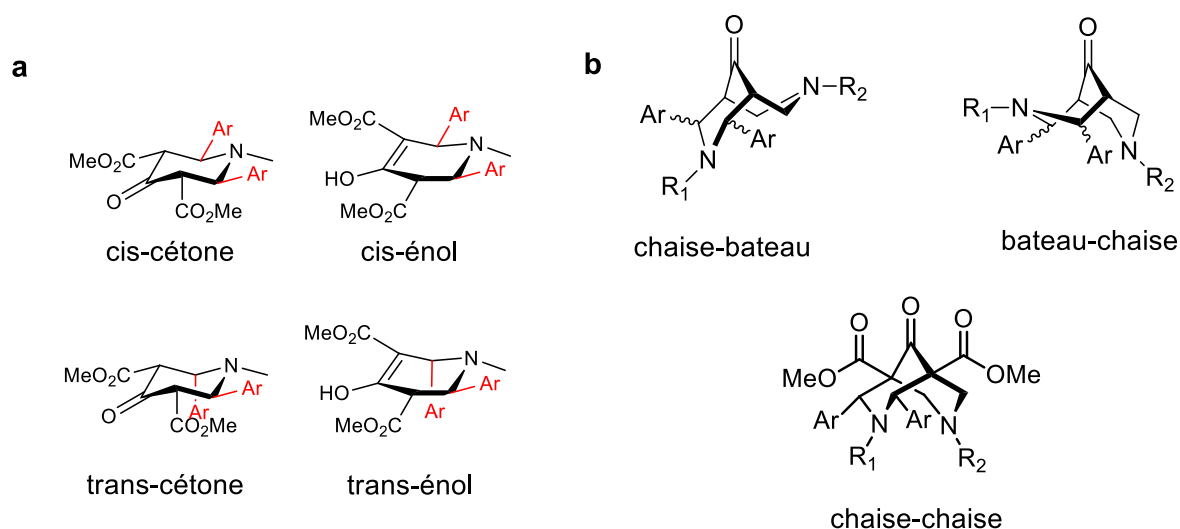


Figure 1.40 : Conformations possibles a) du précurseur pipéridone , b) des bispidones.

La conformation chaise-bateau a déjà été observée lors de l'ajout de gros substituants en position R_2 tel que la fonction 2-pyridylbenzyl.¹¹⁰ Dans ce cas, les pyridines en position C2 et C4 sont en position *trans*. Une conformation chaise-bateau a aussi été observée lorsque que des groupements dibromopyridine ont été ajoutés sur les positions C2 et C4.¹¹¹ Ici encore, ces derniers étaient en position *trans*. Ces substituants forcent aussi l'azote N3 à adopter une géométrie trigonale qui induit une forte répulsion entre les doublets de l'atome N3 et N7 et entraîne ainsi une conformation chaise-bateau.

Du fait de leur application à la chimie de coordination, la majorité des bispidines substituées en position C2 et C4 a été isolée en position chaise-chaise pour laquelle les substituants C2 et C4 sont en position *cis*. Du fait de la présence de la cétone une réaction de type rétro-Mannich est possible. Cette réaction peut entraîner une isomérisation en *cis* ou *trans* et aboutir à un mélange de plusieurs isomères. Pour éviter cette isomérisation, la cétone centrale est très souvent réduite en alcool conduisant ainsi au bispidol.

La conformation *cis*-chaise-chaise est rigide et préorganisée. Elle est donc idéale pour la coordination des métaux. Dans le cadre de cette thèse, c'est cette conformation qui va nous intéresser afin d'obtenir des complexes thermodynamiquement stables et cinétiquement inertes. Les bispidines ont été étudiées pour de nombreuses applications en plus de la chimie médicinale. Ces applications, telles que l'activation de l'oxygène par Cu^I et Co^{II} , les réactions d'oxydation par le fer à haute valence et les réactions d'Henry catalysée au cuivre (II)¹¹² ne

seront pas abordées dans le cadre de cette thèse qui se focalisera sur des applications à l'imagerie médicale. Les lecteurs intéressés par plus de détails pourront se tourner vers les revues suivantes : [109], [113]. Ainsi, seuls les complexes à base de bispidine utilisés pour le radiomarquage seront présentés dans la partie suivante.

2.2. Les radiotraceurs à base de bispidine

Les ligands de type bispidine ont été étudiés pour la coordination d'une variété de métaux tels que le vanadium, le manganèse, le fer, le cobalt, le nickel, l'indium, le lanthane, l'actinium...¹⁰⁹ Néanmoins, c'est avec le cuivre que la bispidine a été le plus souvent étudiée du fait d'une bonne stabilité thermodynamique et d'une sélectivité raisonnable à l'égard de métaux tels que le zinc(II) ou le nickel(II). Mais c'est principalement l'inertie cinétique des complexes formés qui fait de la bispidine un candidat idéal pour le développement de radiotraceur à base de cuivre ⁶⁴. Les différents ligands de type bispidine qui ont été étudiés pour le radiomarquage au cuivre ⁶⁴ seront présentés dans la prochaine sous-partie.

2.2.1. Radiomarquage des bispidines au cuivre ⁶⁴.

En 2008, le groupe de Peter Comba a rapporté l'étude de quatre ligands hexadentates pour le radiomarquage du cuivre ⁶⁴.¹¹⁴ Ces derniers sont substitués par deux groupements méthylène-pyridyl en position R₁ et R₂ (voir Figure 1.38) Le ligand **B**₂ a été obtenu suite à la réduction de la cétone centrale du ligand **B**₁ en présence de tétrahydroborate de sodium dans un mélange dioxane/eau et avec un rendement de 55%. Les deux esters méthyliques ont ensuite été hydrolysés en présence d'hydroxyde de césium, conduisant au ligand **B**₃ avec un rendement de 66 % (Figure 1.41). Le ligand **B**₆ a ensuite été synthétisé en trois étapes à partir de **B**₃. La première étape est l'ajout de groupements acide 4-aminobutyrique aux deux fonctions acides carboxylique par couplage peptidique et la deuxième est l'hydrolyse des ester éthyliques des espaceurs. Finalement, la bombésine, un peptide présentant une grande affinité pour les récepteurs GRP (« Gastrin Release Peptide ») a été ajoutée par couplage peptidique au chélate donnant ainsi le ligand **B**₆ (Figure 1.41).

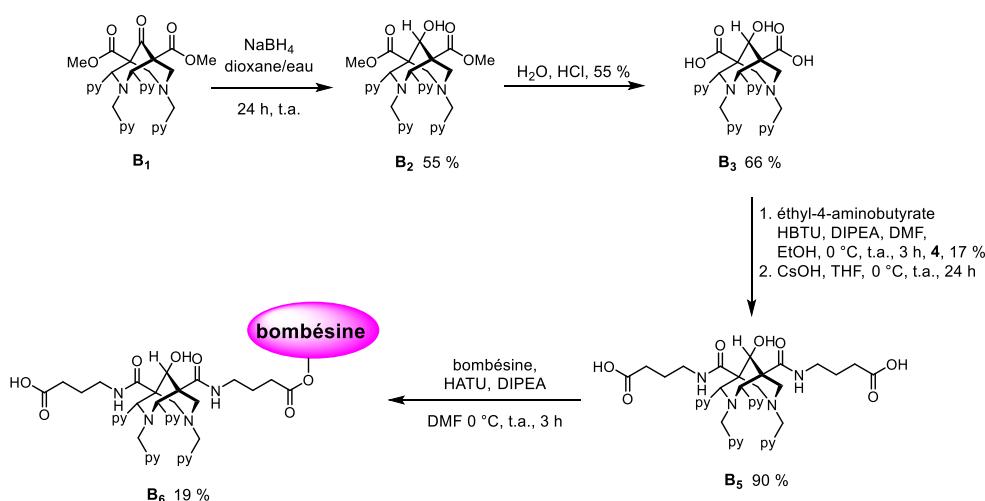


Figure 1.41 : Voie de synthèse des bispidines B_2 à B_6 .

Les quatre ligands ont ensuite été radiomarqués au cuivre 64 et il a été montré que les ligands B_1 à B_3 ont été complètement radiomarqués en moins d'une minute à température ambiante et que les trois complexes étaient inertes face à la transchélation en présence de 1000 équivalents de cyclam et 1000 équivalents de SOD. Pour le ligand B_6 , la complexation est beaucoup plus lente avec une complexation complète au bout d'une heure à température ambiante. Cette différence a été expliquée par une possible première complexation du cuivre sur des donneurs présents sur le peptide tels que les imidazoles ralentissant ainsi la formation du complexe sur la bispidine.

Une étude TEP a été réalisée avec le bioconjugué $^{64}\text{Cu-B}_6$ sur des souris PC-3 porteuses de tumeurs humaines de la prostate. L'accumulation du radiotracer dans les tissus exprimant la GRP a permis la visualisation de la tumeur par PET. Cependant, l'activité a été rapidement éliminée hors de la tumeur ce qui a alors nécessité l'application d'une intensité élevée afin de distinguer la tumeur du bruit de fond (Figure 1.42).

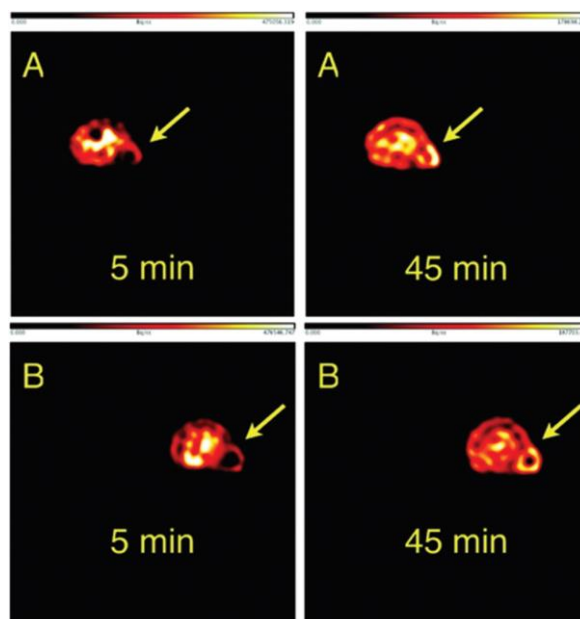


Figure 1.42 : Image TEP d'une coupe coronale du cerveau de deux souris porteuses de tumeurs (A, B) 5 min et 45 min après l'injection de Cu- \mathbf{B}_6 . Les flèches montrent les tumeurs¹¹⁴

Depuis ce premier exemple d'études TEP *in vivo* avec la bispidine, d'autres moyens de fonctionnalisation ont été investigués pour améliorer la complexation avec le cuivre mais aussi pour obtenir des ligands bifonctionnels pour le radiomarquage au cuivre 64.

Une des voies de fonctionnalisation qui a été étudiée est celle sur la position R₂. La fonction est alors ajoutée lors de la synthèse de la bispidone par la double réaction de Mannich. Un premier exemple est la synthèse du ligand **L**₁ obtenu par la voie classique de synthèse des bispidines, soit une double réaction de Mannich entre le précurseur pipéridone **P**₁, la (L)-N-(tert-butoxycarbonyl)glycine et le formaldéhyde et a été obtenue avec un rendement de 67 % (Figure 1.43).¹¹⁵ La cétone centrale a ensuite été réduite en présence de NaBH₄ dans le THF à -78 °C afin d'obtenir le bispidol avec un rendement de 36 %. Le groupement Boc a ensuite été retiré quantitativement en présence d'un mélange TFA/DCM et les esters méthyliques ont été hydrolysés en présence d'hydroxyde de sodium dans un mélange THF/eau permettant ainsi d'accéder au ligand **L**₁ avec un rendement de 71 %.

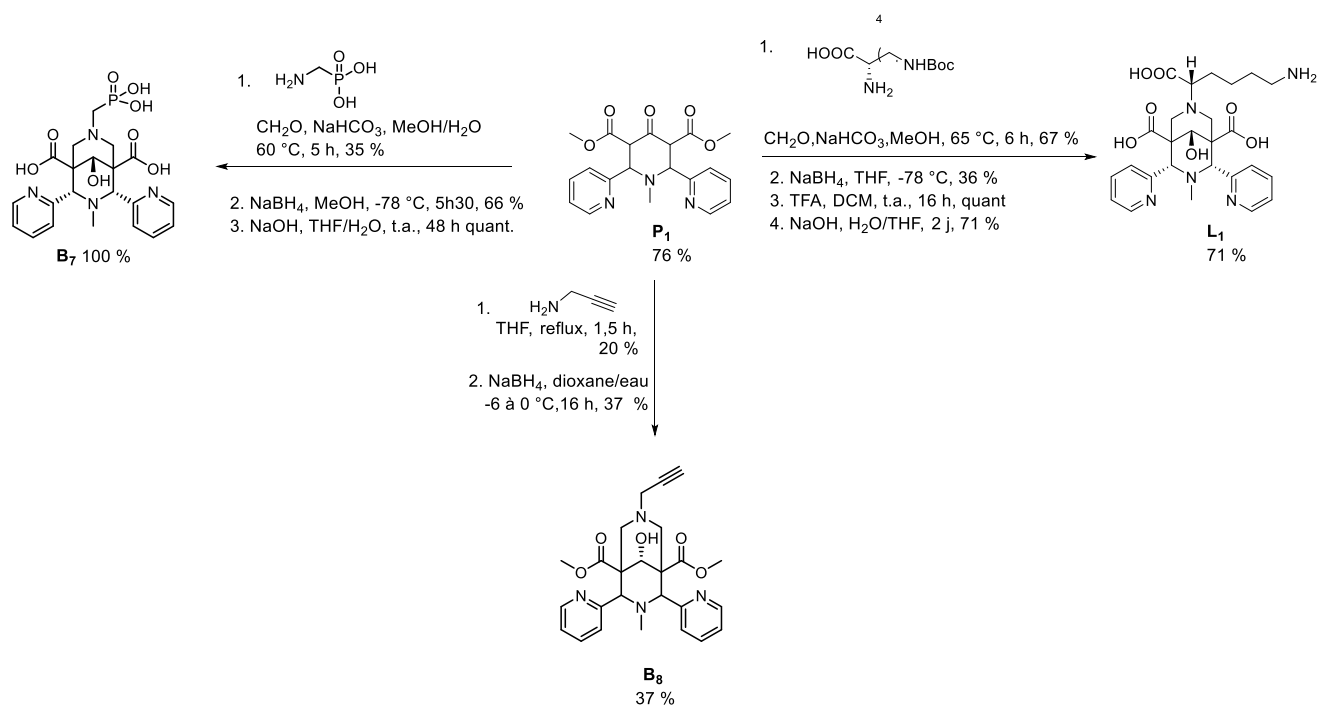


Figure 1.43 : Synthèse des ligands **B₇**, **B₈** et **L₁**.

Une étude de radiomarquage de ce ligand **L₁** avec le cuivre 64 a été réalisée et a montré que le rendement de radiomarquage est proche de 90 % en 5 minutes à température ambiante avec un ratio L/M de 10. Afin de permettre le couplage avec des vecteurs biologiques, la bispidine **L₁** a ensuite été fonctionnalisée de deux façons différentes (Figure 1.44). La première est l'ajout d'un groupement biotine. La biotine est une vitamine qui forme une interaction hydrophobe forte avec la protéine streptavidine. De nombreux vecteurs biologiques portant des streptavidines sont disponibles commercialement. Ainsi, la streptavidine peut être utilisée pour former des adduits très stables avec le ligand bifonctionnel biotinylé obtenu. La synthèse de la bispidine biotinylée **B₉** est réalisée par un couplage peptidique sur la fonction carboxylate de la lysine de **L₁** avec la biotine-NHS en présence de DIPEA dans un mélange DMF/H₂O. Le ligand **B₉** a ainsi été obtenu avec un rendement de 42 %. La seconde fonctionnalisation consiste à ajouter une fonction maléimide sur la bispidine. La fonction maléimide réagit sélectivement sur la fonction thiol présente sur les cystéines. Ici encore, la synthèse du ligand bifonctionnel **B₁₀** a été réalisée par couplage peptidique sur la fonction carboxylate de la lysine avec l'ester maléimide-NHS en présence de N-méthylmorpholine dans un mélange DMF/eau et la bispidine **B₁₀** a été obtenue avec un rendement de 45 % (Figure 1.44). Afin de confirmer la sélectivité de la fonction maléimide avec la cystéine, un peptide modèle contenant une cystéine et une lysine a été couplé à la bispidine **B₁₀**. Un couplage quantitatif a été obtenu et confirmé par spectrométrie de masse MALDI-TOF. L'absence de fonction thiol sur le peptide a été vérifiée

par un test à l'iodoacétamide et a permis de valider la sélectivité de la fonction maléimide pour le thiol.¹¹⁵

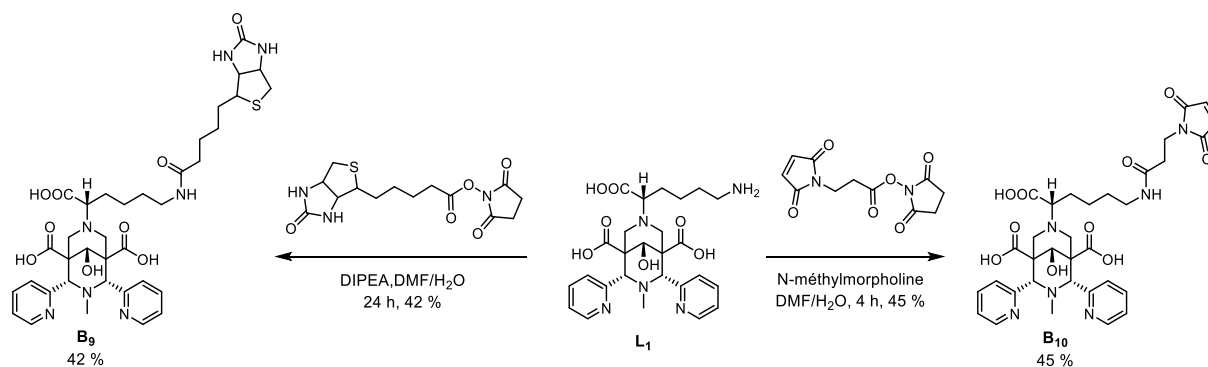


Figure 1.44 : Synthèse des bispidines bifonctionnelles **B₉** et **B₁₀**.

Un second exemple de fonctionnalisation est la synthèse de la bispidine **B₇** avec un bras phosphonate (Figure 1.43).¹¹⁶ L'ajout du bras phosphonate a pour but d'améliorer la sélectivité du ligand pour le cuivre(II) à pH physiologique. La bispidone a été obtenue après une double réaction de Mannich entre l'aminométhylphosphonate, le précurseur **P₁** et le formaldéhyde avec un rendement de 35 %. La cétone centrale a ensuite été réduite en présence de tétrahydroborate de sodium à -78 °C, ce qui a conduit au bispidol avec un rendement de 66 %. Les fonctions méthylester ont finalement été hydrolysées en présence d'hydroxyde de sodium pour finalement donner le ligand **B₇** avec un rendement quantitatif. Des études de radiomarquage ont été menées. Un rendement de radiomarquage de 95 % a été obtenu en 30 min à température ambiante avec un ratio L/M de 1,25. L'efficacité est aussi dépendante du pH car une inertie cinétique plus lente a été observée dans des conditions acides. Un dernier exemple de ce type de fonctionnalisation est la synthèse du ligand **B₈** pour des réactions de bioconjugaison par « click chemistry » (Figure 1.43).¹¹⁷ Il est obtenu par une double réaction de Mannich entre le précurseur **P₁**, le formaldéhyde et la 3-aminopropyne. Le ligand **B₈** a donc été obtenu après la réduction de la cétone centrale avec un rendement de 37 %.

Une deuxième méthode de fonctionnalisation qui a été utilisée pour améliorer la complexation du cuivre est la combinaison de la bispidine et du motif rigide dioxotétraza (Figure 1.45).¹¹⁸ Ainsi trois ligands ont été synthétisés. La première étape était la synthèse des synthons bis(α -chloroacétamide) qui ont été obtenus suite aux réactions de condensation entre le chlorure de chloroacétyle et les diamines 1,2-diaminoéthane, 1,3-diaminopropane et ortho-phénylènediamine. Les synthons sont ensuite condensés avec la 5,7-diméthyl-1,3-

diazabicyclonane ce qui a permis d'accéder aux composés H_2L^B , H_2L^E , H_2L^P avec des rendements de 65 %, 34 % et 74 % respectivement.

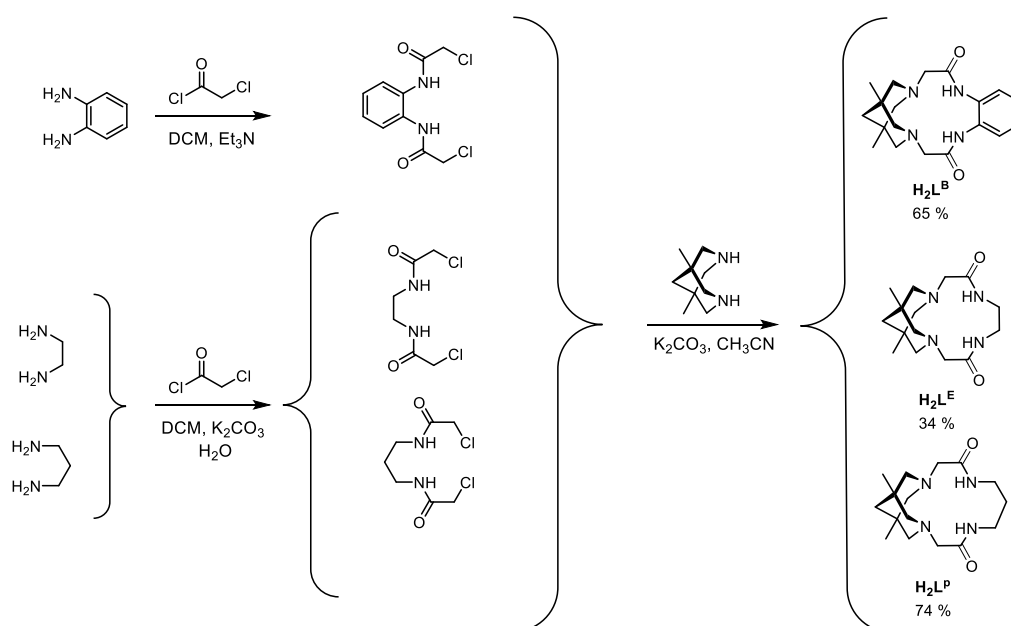


Figure 1.45 : Synthèse des ligands H_2L^B , H_2L^E et H_2L^P .¹¹⁸

Le radiomarquage des trois ligands a été effectué à 50 °C pendant 90 min. Des études de stabilité *in vitro* ont été réalisées en présence de 3 équivalents de superoxyde dismutase (SOD) humaine et dans le sérum humain. Globalement, les trois complexes ont présenté une très haute stabilité avec moins de 5% de dissociation en présence de SOD et dans le sérum humain. Le complexe Cu- H_2L^B a présenté la plus grande stabilité avec un pourcentage de transchélation de 1,5 % en présence de SOD et 2,3 % de dissociation dans le sérum après 1 h d'incubation à 37 °C.

La biodistribution du complexe Cu- H_2L^B a été étudiée chez le rat. 5 minutes après injection, une accumulation a été observée dans le foie, l'intestin et 50 % de la dose injectée était déjà éliminés par les voies hépatobiliaires. Une accumulation significative a aussi été observée dans les tissus adipeux blancs, les muscles et la peau. Ce type de biodistribution a généralement été observée pour des complexes hydrophobes. 60 minutes après injection, l'activité était éliminée du sang et des tissus presque exclusivement par les voies hépatobiliaires, mais des résidus étaient toujours présents dans les reins. 24 heures après injection, la quasi-totalité de l'activité a été retrouvée dans les urines et les excréments. Cette élimination rapide a permis de conclure que le complexe Cu- H_2L^B avait une grande stabilité *in vivo*.¹¹⁸

Un dernier de type fonctionnalisation est celle réalisée sur l'alcool en C9. Elle a été utilisée afin de former des ligands bifonctionnels pour des réactions de couplage avec des vecteurs d'intérêt. Un résumé de ces travaux est présenté en figure 1.46.

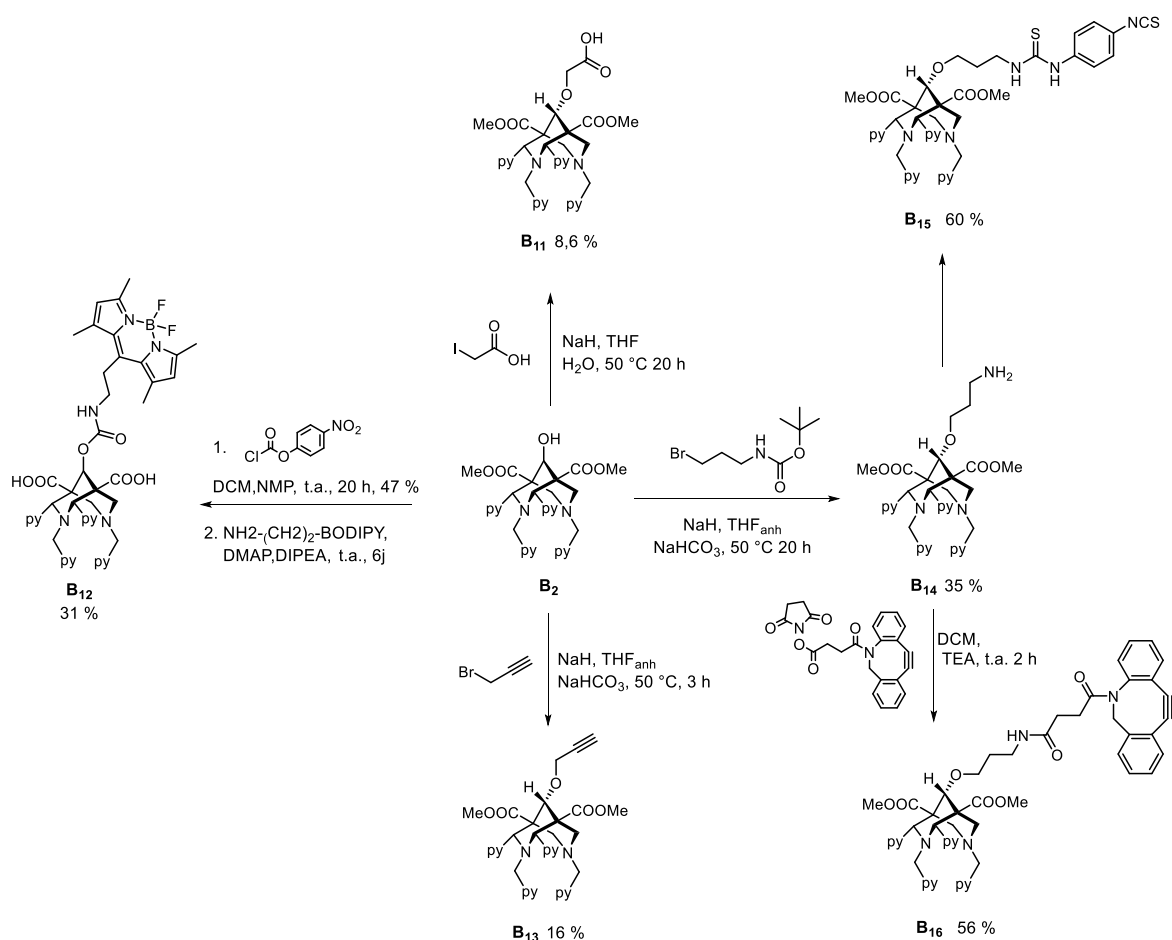


Figure 1.46 : Synthèse des bispidine **B**₁₂ à **B**₁₆.

Le ligand **B**₁₂ a été fonctionnalisé avec un BODIPY pour le développement d'une sonde bimodale TEP-imagerie optique. La synthèse a été effectuée à partir du bispidol **B**₂ qui a subi une réaction de type Williamson avec le chloroformate de 4-nitrophényl en présence de N-méthylmorpholine dans le dichlorométhane (DCM) à température ambiante afin d'accéder à l'ester activé. La bispidine-BODIPY **B**₁₂ a ensuite été synthétisée via une réaction d'addition-élimination entre l'ester 4-nitrophényl et l'amine du BODIPY en présence de 4-diméthylaminopyridine (DMAP) et de diisopropyléthylamine (DIPEA) dans le chloroforme à température ambiante (Figure 1.46). Le ligand **B**₁₂ a été est marqué au cuivre 64 dans des conditions douces (pH 6,2, t.a., 30 min). L'étude de stabilité *in vitro* a montré que le radiocomplexe était stable dans le sérum humain sur une durée d'au moins 24 heures.¹¹⁹

La synthèse des ligands **B**₁₁, **B**₁₃ et **B**₁₄ a débuté par la formation d'un alcoolate sur la bispidol **B**₂ en présence d'hydrure de sodium et a été suivie d'une réaction de substitution nucléophile avec l'acide l'iodoacétique, le bromure de propargyl et le tert-butyl(3-bromopropyl)carbamate respectivement (Figure 1.46).⁶² La bispidine-amine **B**₁₄ a ensuite été utilisée pour ajouter la fonction isothiocyanate avec le *p*-phénylène-diisothiocyanate et la fonction DBCO avec le DCBO-NHS afin d'accéder aux bispidines **B**₁₅ et **B**₁₆. Le radiomarquage des bispidines **B**₁₁ à **B**₁₆ a été effectuée dans des conditions douces. Un rendement de radiomarquage supérieur à 99 % a été obtenu pour les bispidines en 5 minutes à température ambiante. Les cinétiques de décomplexation ont été étudiées par des études de transchélation des cinq complexes en présence de 1000 équivalents de DOTA et d'EDTA à 37 °C pendant 24 h. La formation de ⁶⁴Cu-DOTA et ⁶⁴Cu-EDTA a été suivi par radio-CCM. Après 24 h, aucune transchélation n'a été observée pour les cinq complexes. Le ligand **B**₁₆ a ensuite été couplé à un anticorps cetuximab (qui cible les récepteurs EGFR) par « click chemistry ». Le bioconjugué a été radiomarqué au cuivre 64 avec un rendement de radiomarquage de 99 % et une étude d'imagerie TEP avec le radiocomplexe a finalement été effectuée sur des souris porteuses de tumeurs. Les résultats ont montré que le radiocomplexe ⁶⁴Cu-**B**₁₆' a été rapidement éliminé par voie rénale avec un temps de demi-vie dans le sang de 28,2 min. Après 5 minutes, la tumeur était visible et après une heure, l'activité dans le sang étant éliminé, la tumeur pouvait être clairement délimitée. Un ratio tumeur/muscle de 13 a alors été obtenu (Figure 1.47).

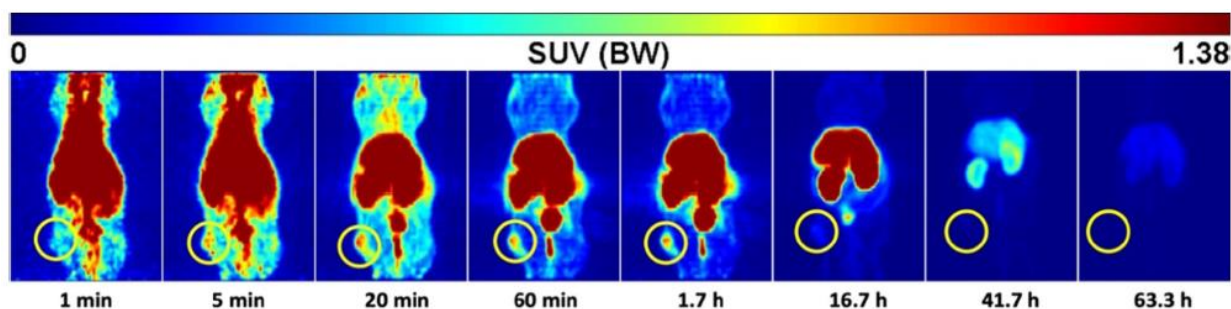


Figure 1.47 : Imagerie TEP dynamique d'une souris porteuse de tumeurs après une injection intraveineuse de ⁶⁴Cu-**B**₁₆'. La tumeur est localisée dans le cercle jaune.⁶²

2.2.2. Radiomarquage avec d'autres radioisotopes.

D'autres radioisotopes ont été étudiés pour des applications en Imagerie par Tomographie à Emission Monophotonique (TEMP, émetteurs γ) et/ou pour la Radiothérapie Interne Vectorisée (RIT, émetteurs β^- , α ou d'électrons Auger). En particulier, deux ligands bispidines octadentates ont été développés pour la complexation des isotopes actinium 225 (α , $t_{1/2} = 10.0$ j), indium 111 (γ , électrons Auger, $t_{1/2} = 2.8$ j) et lutécium 177 (β^- , γ , $t_{1/2} = 6.65$ j).¹²⁰

La première bispidine est composée de deux groupements picolines en position N3 et N7. La synthèse de ce ligand a été réalisée par l'intermédiaire de la bispidine **1** (Figure 1.48). Elle a été obtenue après une double réaction de Mannich entre le précurseur **P2**, la 2,4-diméthoxybenzylamine et le formaldéhyde, suivie de la réduction de la cétone centrale de la bispidone précédemment formée. Le groupement protecteur 2,4-diméthoxybenzylamine a ensuite été retiré avec un mélange de TFA et DCM donnant ainsi le composé **3**. Les amines secondaires ont ensuite été utilisées dans une double réaction de substitution nucléophile avec le *tert*-butyl-6-bromopicolinate **4** afin d'obtenir le composé **(tBu)₂bispa²**, qui après estérification des esters *tert*-butyliques en présence de TFA, a donné le bispidol **H₂bispa²**. Le ligand a été radiomarké à l'actinium 225, à l'indium 111 et au lutécium 177. La stabilité de ces radiocomplexes a été étudiée dans le sérum humain. Après un jour, 87% du complexe d'¹¹¹In et 86% du complexe de ¹⁷⁷Lu était encore intact, montrant des stabilités similaires aux complexes de DOTA. Le radiocomplexe avec ²²⁵Ac a présenté une stabilité plus élevée avec 89 % de radiocomplexe après 7 jours.¹²¹

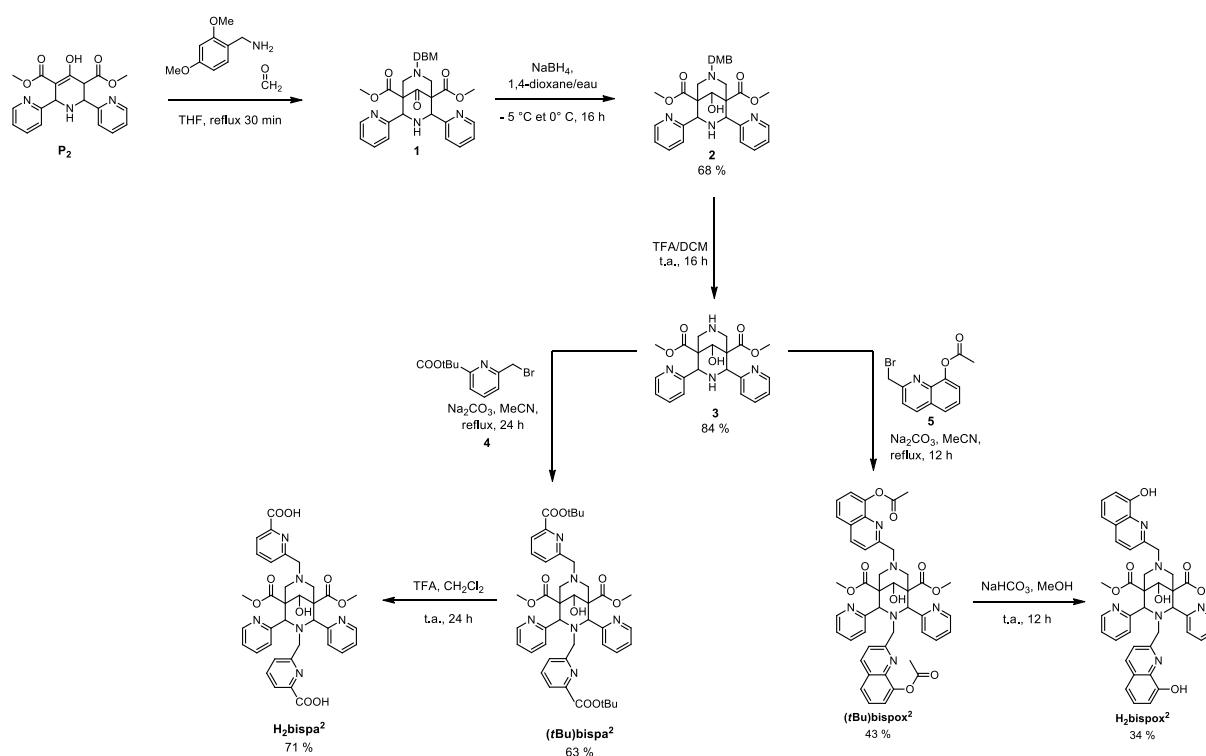


Figure 1.48 : Synthèse des bispidines octadentates H_2bispa^2 et $H_2bispox^2$.^{121,122}

La seconde bispidine octadentate contient des fonctions 8-hydroxyquinoléine sur les deux positions N3 et N7. La voie de synthèse est similaire à celle utilisée pour H_2bispa^2 , sauf qu'ici, l'agent alkylant pour la double réaction de substitution nucléophile est l'acétate de 2-(bromométhyl)quinoline-8-yl **5**. La déprotection des groupements acétate a ensuite permis d'obtenir le ligand $H_2bispox^2$ (Figure 1.48). Le radiomarquage du ligand a été effectué avec l'indium 111 et le lutécium 177. Le radiomarquage avec l'indium 111 a été réalisé quantitativement à température ambiante tandis qu'un chauffage à 37 °C a été nécessaire pour un radiomarquage quantitatif en 30 min avec $^{177}Lu^{3+}$. Le radiomarquage à l'actinium 225 a aussi été essayé mais une réaction à température ambiante n'ayant pas pu être réalisée, l'étude n'a pas été poursuivie. La stabilité du radiocomplexe $^{111}In-H_2bispox^2$ a été étudiée dans le sérum humain à 37 °C. Après 5 jours, 89 % du complexe était présent ce qui est comparable à la stabilité de $^{111}In-bispa^2$.¹²²

En 2020, des bispidines ont été étudiées pour le radiomarquage au bismuth(III) 213 (α , $t_{1/2} = 46.5$ min), pour des applications en radiopharmaceutique. Trois nouvelles bispidine heptadentates ont été synthétisées (Figure 1.49).¹²³

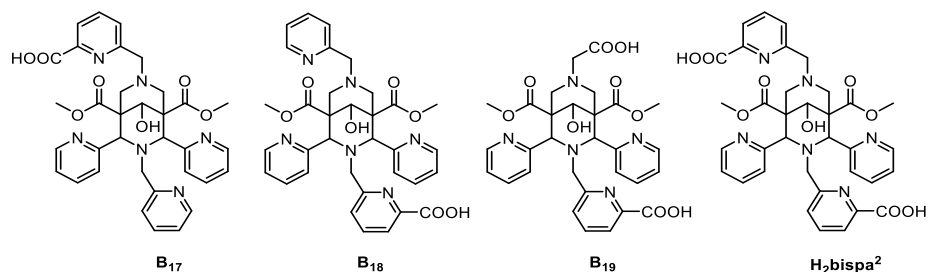


Figure 1.49 : Structures des bispidines étudiées.

Le ligand **B17** est obtenu à partir d'une alkylation du composé **6** avec le tert-butyl-6(bromo-méthyl)picolinate suivi de la déprotection de l'ester *tert*-butylique (Figure 1.50).

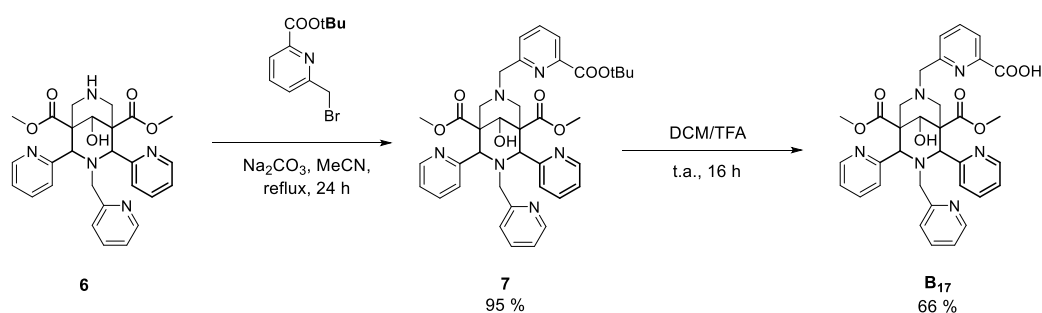


Figure 1.50 : Synthèse du ligand **B17**.

Le ligand **B18** a été obtenu par la même méthode que les ligands H₂bispa² (Figure 1.48) avec le groupement protecteur 2,4-diméthoxybenzylamine. Une fois la bispidine **2** obtenue, une réaction de substitution nucléophile avec le *tert*-butyl-6-bromopicolinate a été réalisée sur l'amine en N3, ce qui a permis d'accéder au composé **8**. Le groupement protecteur a ensuite été retiré afin de libérer l'amine secondaire en N7. Le ligand **B18** est finalement été obtenu par une seconde réaction de substitution nucléophile avec l'acide bromoacétique réalisée sur l'amine secondaire de **9** (Figure 1.51).

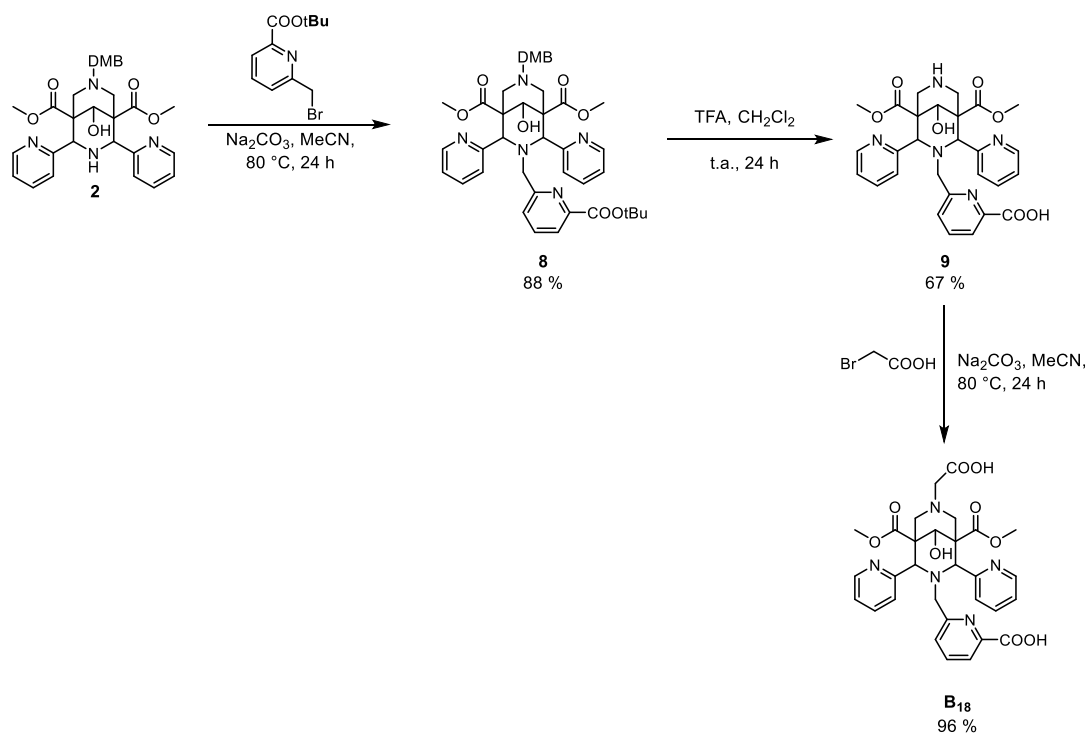


Figure 1.51 : Synthèse du ligand **B**₁₈¹²⁴.

La synthèse du ligand **B**₁₉ a débutée par la formation de la bispidone **10** qui a été obtenu après une double réaction de Mannich entre le précurseur **P**₂, le formaldéhyde et la 2-picolylamine et la cétone centrale de la bispidone a été réduite pour donner la bispidol **11** (Figure 1.52).¹²³ Une réaction de substitution nucléophile a ensuite été réalisée sur l'amine secondaire afin d'intégrer le groupement picolinate en position N3. Le ligand **B**₁₉ a finalement été obtenu après la déprotection des esters tert-butylques de **12**.

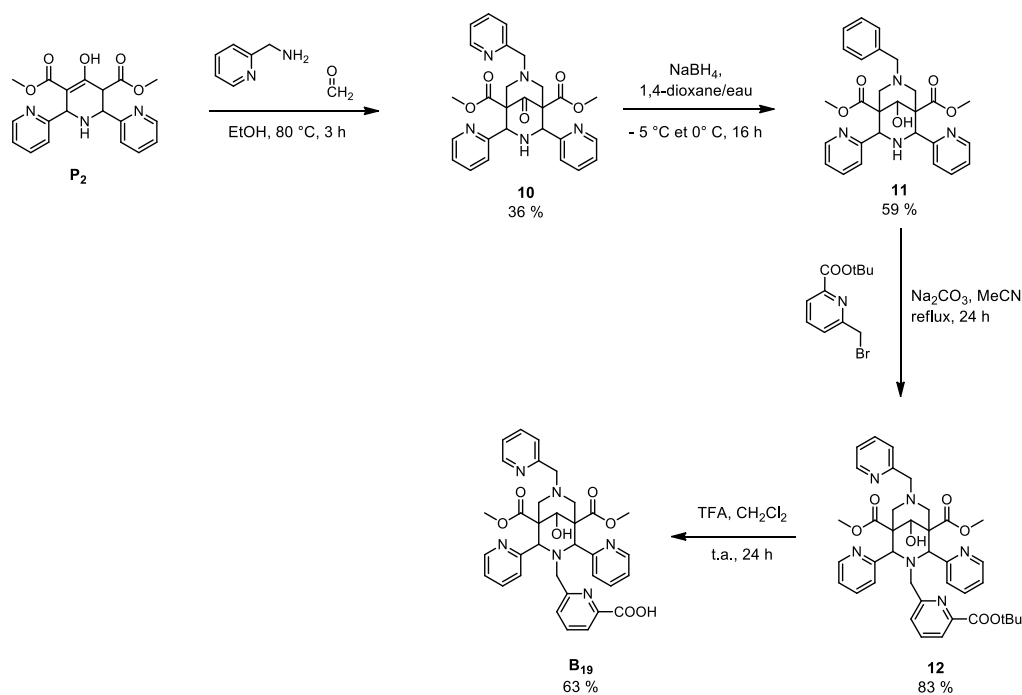


Figure 1.52 : Synthèse de la bispidine **B₁₉**.

Un radiomarquage des ligands **B₁₇**, **B₁₉** et **H₂bispa²** au bismuth 213 a été effectué.¹²³ L'efficacité du radiomarquage a été comparée à celle de CHX-A-DTPA (Figure 1.20) et DOTA qui sont les meilleurs chélateurs du bismuth. Les trois ligands ont montré une meilleure efficacité de radiomarquage que DOTA et CHX-A-DTPA. Une étude de transchélation en présence de DTPA a aussi été réalisée et elle a montré que ²¹³Bi-H₂bispa² était aussi stable que ²¹³Bi-CHX-A-DTPA tandis que ²¹³Bi-**B₁₇** et ²¹³Bi-**B₁₉** étaient moins inertes. De plus, une différence de résistance à la transchélation a été observée pour ²¹³Bi-**H₂bispa²** selon que la réaction de complexation ait été réalisée à 25 ou 95 °C. En effet, il semble qu'à 25 °C des espèces labiles, qui subissent une démétallation rapide, et des espèces plus inertes semblables à celles obtenues à 95 °C sont formées. L'hypothèse qui a été émise était qu'à 25 °C, la complexation se ferait en deux étapes. Premièrement, les carboxylates du ligand **H₂bispa²** remplaceraient d'abord deux iodures de [BiI₅]²⁻ conduisant à [BiI₃H₂bispa²]^{x-}. Ensuite, réarrangement, plus lent, conduirait aux mêmes espèces qui ont été obtenues instantanément à 95 °C.

Un autre radioisotope qui a été utilisé pour radiomarquer la bispidine est le gallium 68 (β^+ , $t_{1/2} = 1.1\text{h}$).^{115,124} En effet, en 2020, Price et al. ont conjugué une bispidine et une porphyrine pour le développement d'un agent de contraste théranostique pour la TEP et la Thérapie Photodynamique (TPD). Le gallium 68 ($t_{1/2} = 1,1\text{ h}$) est un émetteur de positron intéressant pour la TEP du fait de son accessibilité. Pour la TPD, la porphyrine a été choisie pour sa faible toxicité, sa grande phototoxicité, sa facilité de synthèse et ses propriétés de ciblage des tumeurs. La synthèse du ligand **L**₁ a été précédemment décrite (Figure 1.43). Son radiomarquage avec le gallium 68 a été effectuée à pH 4 pour éviter la formation d'hydroxyde de gallium. Un rendement de radiomarquage (RR) de 94 % a été obtenu en 30 min en chauffant à 85 °C et en utilisant une concentration élevée en ligand (200 μM). En terme de cinétique de complexation le ligand est moins efficace que NOTA (95 % de RR, 95 °C, pH 3,5, 10 min, 10 μM) et que son analogue phosphonique TRAP (95 °C, $c < 3\ \mu\text{M}$, 5 min, pH 3)¹²⁵ mais cela peut s'expliquer par la plus faible denticité du ligand **L**₁. La synthèse du conjugué bispidine-porphyrine **B**₂₀ a été réalisée par un couplage au niveau de l'amine primaire de la lysine avec la porphyrine-NHS en présence de triéthylamine dans le DMF. Le ligand **B**₂₀ a été obtenu avec un rendement de 48 % (Figure 1.53).

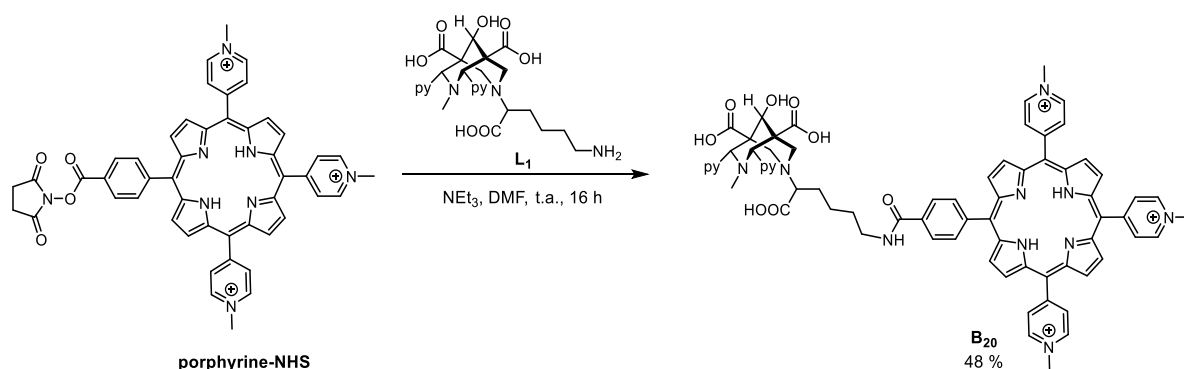


Figure 1.53 : Synthèse de la bispidine-porphyrine **B**₂₀.¹¹⁵

Le radiomarquage de **B**₂₀ a ensuite été effectué avec les meilleures conditions obtenues pour **L**₁ (200 μM de **L**₁, pH 4,5, 15 min, 95 °C). La stabilité du complexe a été monitorée dans le sérum foetal de veau (FBS) et l'étude a montré qu'après 2 heures aucune démetalation n'était observée. La phototoxicité du radiocomplexe ⁶⁸Ga-**B**₂₀ a été étudiée sur des cellules humaines d'adénocarcinome. Après incubation des cellules avec ⁶⁸Ga-**B**₂₀, une irradiation de ces dernières a été effectuée et ces cellules ont été comparées à des cellules contrôles non irradiées. Les résultats ont montré que 90 % des cellules étaient détruites avec 50 μM de ⁶⁸Ga-**B**₂₀. Cette

phototoxicité est comparable à celle du Photofrin[®], un agent PDT qui a prouvé son efficacité sur ce même type de cellules.¹²⁶

2.3. Les bispidines pour la complexation du manganèse(II/III).

La complexation du manganèse avec des bispidines tétradentates a été décrite depuis 1997 par Peter Comba.¹²⁷ Depuis peu d'études ont été réalisées sur ce type de complexes. Parmi elles, on retrouve les réactions d'oxydation avec des complexes de manganèse d'haute valence. En effet, les bispidines ont été utilisées pour la complexation du manganèse(III)-peroxo. Le but était de comprendre le mécanisme de réactions biologiques telles que les transferts d'atome d'oxygène impliquant des complexes de manganèse (SOD, Photosystème II...).

Ainsi, la réactivité de deux complexes de bispidine-manganèse-peroxo a été étudiée dans des réactions de déformylation dont le mécanisme restait inconnu. Le complexe $[\text{Mn}^{\text{III}}(\mathbf{B}_{20})(\text{O}_2)]^+$ (Figure 1.64) a alors été synthétisés en oxydant le complexe $\text{Mn}^{\text{II}}(\mathbf{B}_{20})(\text{ClO}_4)_2]^{2+}$ en présence de H_2O_2 afin de générer un complexe peroxo de haute valence.¹²⁸

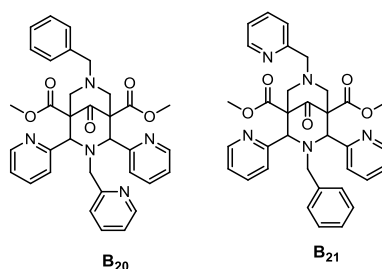


Figure 1.64 : Structures des ligands étudiés pour le transfert d'oxygène.

Ensuite, la réaction de déformylation de la 2-phénylpropionaldéhyde (2-PPA) avec l'intermédiaire $[\text{Mn}^{\text{III}}(\mathbf{B}_{20})(\text{O}_2)]^+$ a été réalisée. L'analyse de la cinétique de cette réaction ainsi que des modélisations par mécanique quantique (Density-Fonctional Theory = DFT) ont permis de conclure que le mécanisme de cette réaction débutait par l'abstraction de l'atome d'hydrogène en alpha et non par une addition nucléophile comme ce qui avait été précédemment proposé (Figure 1.65).

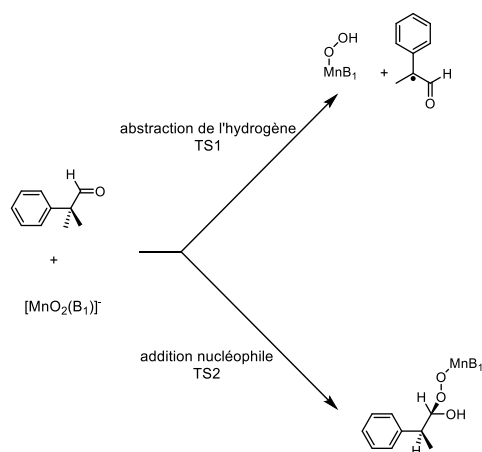


Figure 1.65 : Mécanismes possibles de la déformylation

Une seconde étude a été réalisée afin de savoir si la structure du ligand pouvait influencer le mécanisme de la réaction.¹²⁹ Pour cela, l'isomère du ligand **B1** a été utilisé afin de générer le complexe $[\text{Mn}^{\text{III}}(\mathbf{B}_{21})(\text{O}_2)]^+$. La même réaction de déformylation avec 2-PPA a été réalisée et une première étape par abstraction de l'hydrogène en alpha de l'aldéhyde a aussi été identifiée. De plus, le mécanisme de l'étape cinétiquement déterminante a pu être précisé par DFT. Après l'abstraction de l'hydrogène un réarrangement céto-énolique aurait lieu. La double liaison de la fonction énol subirait une addition nucléophile du complexe ce qui est plus faible en énergie qu'une attaque directe sur le carbonyle et donc plus probable.

Une seconde application des bispidines avec le manganèse concerne le développement de polymères de coordination (CPs, en anglais) dynamiques. Ces types de matériaux sont très intéressants pour leurs adaptabilités, leurs flexibilités et sont prometteurs pour le développement d'adsorbants sélectifs, de capteurs et de matériaux catalytiques. Ainsi, les ligands **B22** et **B23** ont été synthétisés afin de permettre la formation de CPs (Figure 1.66). La structure RX de ces ligands permet d'observer la coordination du métal au niveau des azotes des pyridines.

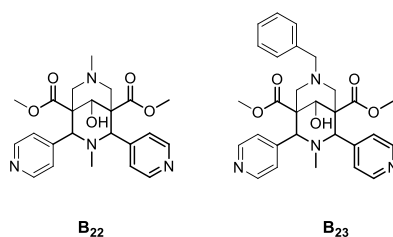


Figure 1.66 : Ligands utilisés pour la synthèse de polymères de coordination.

La synthèse de ces CPs a été réalisée avec chacun des ligands en présence de $MnCl_2$ et après cristallisation, les structures des CPs ont pu être observées. Une structure 1D de type ruban a été obtenue avec une coordination octaédrique du manganèse par deux chlorures apicaux et les azotes des pyridines de quatre ligands différents (Figure 1.67).

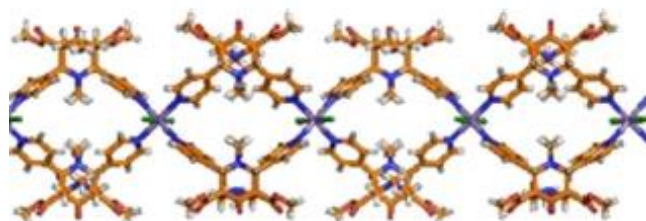


Figure 1.67 : Structure cristallographique de type « ruban » avec le ligand **B₂₂**.¹²⁹

Des poudres microcristallines ont été isolées pour les deux ligands et dans différents solvants, à savoir le nitrobenzène = NB, le trichlorométhane = TCM et le 1,2-dichlorobenzène = DCB. Pour chacun des batchs, des molécules de solvant ont été piégées dans la structure, donnant lieu aux composés suivants : P3.NB, 3.TCM et 3.DCB avec le ligand **B₂₂** et 4.NB, 4.TCM et 4.DCB avec le ligand **B₂₃**.

Afin d'investiguer le caractère dynamique de ces CPs, des études d'échange de solvant solide/liquide et solide/vapeur ont été réalisées. Les trois poudres du ligand **B₂₂** (3.NB, 3.TCM et 3.DCB) ont été plongées dans le nitrobenzène et dans les trois cas un échange entre la molécule de solvant piégée et le nitrobenzène a été observé. Pour les poudres du ligand **B₂₃** (4.NB, 4.TCM et 4.DCB), la même transformation n'a pas pu se faire. Cette différence de dynamisme a été attribuée à une interaction inter-ruban plus grande avec **B₂₃** du fait de la présence du groupement benzyl.

3. Contexte du travail de thèse.

Peu avant mon arrivée en doctorat, une étude exploratoire avait été réalisée avec le ligand L_1 (Figure 1.68) précédemment synthétisé par l'équipe Synpa.¹¹⁵ Le complexe de manganèse(II) avait été synthétisé et sa relaxivité mesurée. La relaxivité de ce complexe s'est révélée élevée ($4,23 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, à 25 °C et 60 MHz) et donc prometteurs pour un agent de contraste à base de manganèse. L'objectif de cette thèse a donc été de poursuivre cette étude en étudiant les complexes de bispidine-manganèse pour des applications en IRM mais aussi en TEP avec le manganèse 52 . Pour cela, le ligand L_1 et de nouveaux analogues de ce dernier ont été synthétisés dans le but d'étudier l'influence de la structure du ligand bispidine et de ses substituants sur la stabilité thermodynamique, l'inertie cinétique et la relaxivité des complexes de manganèse(II) obtenus.

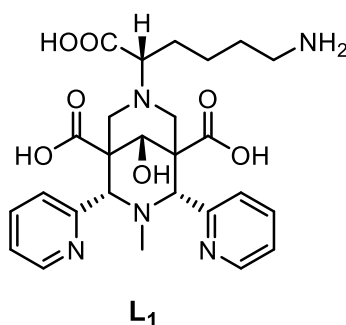


Figure 1.68 : Structure du ligand L_1 .

Six nouveaux ligands pentadentates ont été synthétisés dans le but d'obtenir des complexes de Mn(II) monohydratés, critère important pour l'IRM. Les ligands (représentés à la Figure 1.69) possèdent les modifications structurales (par rapport au ligand L_1) suivantes:

- ligands L_2 : réduction des carboxylates (sur les positions 1 et 5) en alcools dans le but d'observer l'influence de la charge du complexe ;
- ligands L_2 et L_4 : modification du nombre de fonctions carboxylate (0 pour L_2 , 2 pour L_1 , 3 pour L_4) pour investiguer leur rôle éventuel dans la présence d'une seconde sphère de coordination ;
- ligand L_3 : masquage de l'amine primaire pour étudier son rôle tant au niveau de la stabilité du complexe qu'au niveau de la relaxivité ;
- ligands L_5 et L_7 pour observer l'influence de la position du bras coordinant sur la stabilité du complexe ;
- ligand L_6 pour augmenter la rigidité du complexe et potentiellement l'encombrement stérique au niveau de la molécule d'eau et évaluer leur effet au niveau de la relaxivité ;

De plus, le ligand hexadentate **L₈** a également été synthétisé dans le but d'étudier l'augmentation du nombre de donneurs sur la stabilité des complexes et de mesurer la relaxivité de sphère externe en fournissant un analogue non-hydraté.

Un nouveau ligand octadentate (**L₉**) a aussi été synthétisé pour des métaux ayant un nombre de coordination plus grand que celui du manganèse. Nous pouvons penser scandium(IV), au zirconium(IV) et aux lanthanides(III).

Enfin les propriétés physico-chimique du complexe de Mn^{2+} avec le ligand phosphonaté **L₁₀** (précédemment synthétisé au laboratoire), seront aussi étudiés afin de la comparer à son analogue carboxylaté **L₅**.

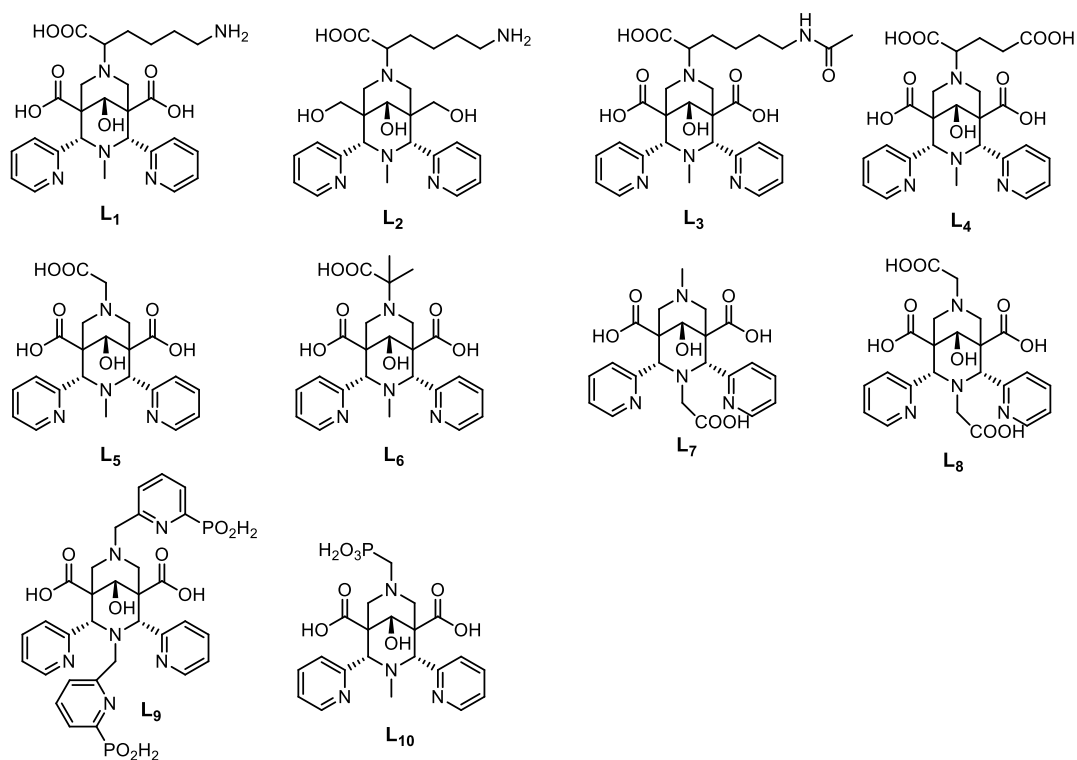


Figure 1.69 : Ligands cibles.

Ainsi la synthèse des différents ligands sera présentée dans le chapitre (II). Ensuite, la physico-chimie et la relaxivité des différents complexes de manganèse ont été étudiées et seront abordées dans le chapitre III. Enfin, l'application du complexe MnL_1 en IRM et en TEP a été investiguée. La fonctionnalisation du ligand et les études IRM et TEP seront abordées dans le chapitre IV.

4. Références

- (1) Case, T. D. Ultrasound Physics and Instrumentation. *Surgical Clinics of North America* **1998**, 78 (2), 197–217. [https://doi.org/10.1016/S0039-6109\(05\)70309-1](https://doi.org/10.1016/S0039-6109(05)70309-1).
- (2) Collège National des Enseignants de Biop; Collège des enseignants de radiologie de France; Collège médical français des professeurs. *Imagerie Médicale: Les Fondamentaux : Radioanatomie, Biophysique, Techniques et Séméiologie En Radiologie et Médecine Nucléaire.*; 2017.
- (3) Pimlott, S. L.; Sutherland, A. Molecular Tracers for the PET and SPECT Imaging of Disease. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40 (1), 149–162. <https://doi.org/10.1039/B922628C>.
- (4) Boccara, C. Vers Une Imagerie Optique Du Corps Humain ? *Reflets phys.* **2009**, No. 13, 10–13. <https://doi.org/10.1051/refdp/2009001>.
- (5) Mattson, J.; Simon, M. *The Pioneers of NMR and Magnetic Resonance in Medicine: The Story of MRI*; Bar-Ilan University Press ; published in the U.S.A. by Dean Books Co: Ramat Gan, Israel : Jericho, N.Y, 1996.
- (6) Lauterbur, P. C. Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance. *Nature* **1973**, 242 (5394), 190–191. <https://doi.org/10.1038/242190a0>.
- (7) Mansfield, P.; Grannell, P. K. NMR “diffraction” in Solids? *J. Phys. C: Solid State Phys.* **1973**, 6 (22), L422–L426. <https://doi.org/10.1088/0022-3719/6/22/007>.
- (8) Damadian, R.; Goldsmith, M.; Minkoff, L. NMR in Cancer: XVI. FONAR Image of the Live Human Body. *Physiol. Chem. Phys.* **1977**, 9 (1), 97–100, 108.
- (9) *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**. <https://doi.org/10.1002/9781118503652>.
- (10) Brown, R. W. *Magnetic Resonance Imaging: Physical Principles and Sequence Design*; Wiley Blackwell: Hoboken, New Jersey, **2014**.
- (11) Runge, V. M. Critical Questions Regarding Gadolinium Deposition in the Brain and Body After Injections of the Gadolinium-Based Contrast Agents, Safety, and Clinical Recommendations in Consideration of the EMA’s Pharmacovigilance and Risk Assessment Committee Recommendation for Suspension of the Marketing Authorizations for 4 Linear Agents: *Investigative Radiology* **2017**, 52 (6), 317–323. <https://doi.org/10.1097/RLI.0000000000000374>.
- (12) Wahsner, J.; Gale, E. M.; Rodríguez-Rodríguez, A.; Caravan, P. Chemistry of MRI Contrast Agents: Current Challenges and New Frontiers. *Chem. Rev.* **2019**, 119 (2), 957–1057. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00363>.
- (13) Ahn, S. S.; Kim, M.-J.; Lim, J. S.; Hong, H.-S.; Chung, Y. E.; Choi, J.-Y. Added Value of Gadoteric Acid-Enhanced Hepatobiliary Phase MR Imaging in the Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma. *Radiology* **2010**, 255 (2), 459–466. <https://doi.org/10.1148/radiol.10091388>.
- (14) An, S. K.; Lee, J. M.; Suh, K.-S.; Lee, N. J.; Kim, S. H.; Kim, Y. J.; Han, J. K.; Choi, B. I. Gadobenate Dimeglumine-Enhanced Liver MRI as the Sole Preoperative Imaging

- Technique: A Prospective Study of Living Liver Donors. *Am. J. Roentgenology* **2006**, *187* (5), 1223–1233. <https://doi.org/10.2214/AJR.05.0584>.
- (15) de Haën, C.; Anelli, P. L.; Lorusso, V.; Morisetti, A.; Maggioni, F.; Zheng, J.; Uggeri, F.; Cavagna, F. M. Gadocoletic Acid Trisodium Salt (B22956/1): A New Blood Pool Magnetic Resonance Contrast Agent With Application in Coronary Angiography. *Invest. Radio.* **2006**, *41* (3), 279–291. <https://doi.org/10.1097/01.rli.0000195848.17065.13>.
- (16) Herborn, C. U.; Schmidt, M.; Bruder, O.; Nagel, E.; Shamsi, K.; Barkhausen, J. MR Coronary Angiography with SH L 643 A: Initial Experience in Patients with Coronary Artery Disease. *Radiology* **2004**, *233* (2), 567–573. <https://doi.org/10.1148/radiol.2332031545>.
- (17) Port, M.; Idée, J.-M.; Medina, C.; Robic, C.; Sabatou, M.; Corot, C. Efficiency, Thermodynamic and Kinetic Stability of Marketed Gadolinium Chelates and Their Possible Clinical Consequences: A Critical Review. *Biometals* **2008**, *21* (4), 469–490. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9135-x>.
- (18) Grobner, T. Gadolinium – a Specific Trigger for the Development of Nephrogenic Fibrosing Dermopathy and Nephrogenic Systemic Fibrosis? *Nephrology Dialysis Transplantation* **2006**, *21* (4), 1104–1108. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfk062>.
- (19) High, W. A.; Ayers, R. A.; Chandler, J.; Zito, G.; Cowper, S. E. Gadolinium Is Detectable within the Tissue of Patients with Nephrogenic Systemic Fibrosis. *Journal of the American Academy of Dermatology* **2007**, *56* (1), 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2006.10.047>.
- (20) Tombach, B.; Bremer, C.; Reimer, P.; Schaefer, R. M.; Ebert, W.; Geens, V.; Heindel, W. Pharmacokinetics of 1M Gadobutrol in Patients with Chronic Renal Failure. *Invest. Radio.* **2000**, *35* (1), 35. <https://doi.org/10.1097/00004424-200001000-00004>.
- (21) Frenzel, T.; Lengsfeld, P.; Schirmer, H.; Hütter, J.; Weinmann, H.-J. Stability of Gadolinium-Based Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents in Human Serum at 37°C. *Invest. Radio.* **2008**, *43* (12), 817–828. <https://doi.org/10.1097/RLI.0b013e3181852171>.
- (22) Kanda, T.; Ishii, K.; Kawaguchi, H.; Kitajima, K.; Takenaka, D. High Signal Intensity in the Dentate Nucleus and Globus Pallidus on Unenhanced T1-Weighted MR Images: Relationship with Increasing Cumulative Dose of a Gadolinium-Based Contrast Material. *Radiology* **2014**, *270* (3), 834–841. <https://doi.org/10.1148/radiol.13131669>.
- (23) 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>.
- (24) Murata, N.; Gonzalez-Cuyar, L. F.; Murata, K.; Fligner, C.; Dills, R.; Hippe, D.; Maravilla, K. R. Macrocyclic and Other Non-Group 1 Gadolinium Contrast Agents Deposit Low Levels of Gadolinium in Brain and Bone Tissue: Preliminary Results From 9 Patients With Normal Renal Function. *Invest. Radio.* **2016**, *51* (7), 447–453. <https://doi.org/10.1097/RLI.0000000000000252>.
- (25) Gianolio, E.; Bardini, P.; Arena, F.; Stefania, R.; Di Gregorio, E.; Iani, R.; Aime, S. Gadolinium Retention in the Rat Brain: Assessment of the Amounts of Insoluble

- Gadolinium-Containing Species and Intact Gadolinium Complexes after Repeated Administration of Gadolinium-Based Contrast Agents. *Radiology* **2017**, 285 (3), 839–849. <https://doi.org/10.1148/radiol.2017162857>.
- (26) Toft, K. G.; Hustvedt, S. O.; Grant, D.; Martinsen, I.; Gordon, P. B.; Friisk, G. A.; Korsmo, A. J.; Skotland, T. Metabolism and Pharmacokinetics of MnDPDP in Man. *Acta Radiol* **1997**, 38 (4 Pt 2), 677–689.
- (27) Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Vander Elst, L.; Muller, R. N. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev.* **2008**, 108 (6), 2064–2110. <https://doi.org/10.1021/cr068445e>.
- (28) Singh, N.; Jenkins, G. J. S.; Asadi, R.; Doak, S. H. Potential Toxicity of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPION). *Nano Reviews* **2010**, 1 (1), 5358. <https://doi.org/10.3402/nano.v1i0.5358>.
- (29) Wang, Y.-X. J. Superparamagnetic Iron Oxide Based MRI Contrast Agents: Current Status of Clinical Application. *Quant. Imaging Med. Surg.* **2011**, 1 (1), 35–40. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4292.2011.08.03>.
- (30) 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>.
- (31) 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>.
- (32) Aime, S.; Barge, A.; Botta, M.; Parker, D.; De Sousa, A. S. Prototropic vs Whole Water Exchange Contributions to the Solvent Relaxation Enhancement in the Aqueous Solution of a Cationic Gd³⁺ Macrocyclic Complex. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119 (20), 4767–4768. <https://doi.org/10.1021/ja963743m>.
- (33) Nonat, A.; Fries, P. H.; Pécaut, J.; Mazzanti, M. Structure, Stability, Dynamics, High-Field Relaxivity and Ternary-Complex Formation of a New Tris(Aquo) Gadolinium Complex. *Chem. Eur. J.* **2007**, 13 (30), 8489–8506. <https://doi.org/10.1002/chem.200601856>.
- (34) Aime, S.; Barge, A.; Botta, M.; Parker, D.; De Sousa, A. S. Prototropic vs Whole Water Exchange Contributions to the Solvent Relaxation Enhancement in the Aqueous Solution of a Cationic Gd³⁺ Macrocyclic Complex. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119 (20), 4767–4768. <https://doi.org/10.1021/ja963743m>.
- (35) Aime, S.; Botta, M.; Fasano, M.; Paoletti, S.; Terreno, E. Relaxometric Determination of the Exchange Rate of the Coordinated Water Protons in a Neutral GdIII Chelate. *Chem. Eur. J.* **1997**, 3 (9), 1499–1504. <https://doi.org/10.1002/chem.19970030918>.
- (36) 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**, 23, 3027. <https://doi.org/10.1039/b719704g>.
- (37) Nonat, A.; Giraud, M.; Gateau, C.; Fries, P. H.; Helm, L.; Mazzanti, M. Gadolinium(III) Complexes of 1,4,7-Triazacyclononane Based Picolinate Ligands: Simultaneous Optimization of Water Exchange Kinetics and Electronic Relaxation. *Dalton Trans.* **2009**, 38, 8033. <https://doi.org/10.1039/b907738c>.

- (38) De León-Rodríguez, L. M.; Martins, A. F.; Pinho, M. C.; Rofsky, N. M.; Sherry, A. D. Basic MR Relaxation Mechanisms and Contrast Agent Design: MR Relaxation Mechanisms and Contrast Agents. *J. Magn. Reson. Imaging* **2015**, *42* (3), 545–565. <https://doi.org/10.1002/jmri.24787>.
- (39) Aime, S.; Batsanov, A. S.; Botta, M.; Howard, J. A. K.; Parker, D.; Senanayake, K.; Williams, G. Solution and Solid-State Characterization of Highly Rigid, Eight-Coordinate Lanthanide(III) Complexes of a Macrocyclic Tetrabenzylphosphinate. *Inorg. Chem.* **1994**, *33* (21), 4696–4706. <https://doi.org/10.1021/ic00099a020>.
- (40) Botta, M. Second Coordination Sphere Water Molecules and Relaxivity of Gadolinium(III) Complexes: Implications for MRI Contrast Agents. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2000**, *2000* (3), 399–407. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0682\(200003\)2000:3<399::AID-EJIC399>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0682(200003)2000:3<399::AID-EJIC399>3.0.CO;2-B).
- (41) Geraldès, C. F. G. C.; Brown, R. D.; Cacheris, W. P.; Koenig, S. H.; Sherry, A. D.; Spiller, M. Evaluation of Polyaza Macrocyclic Methylene Phosphonate Chelates of Gd^{3+} Ions as MRI Contrast Agents. *Magn. Reson. Med.* **1989**, *9* (1), 94–104. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910090111>.
- (42) Helm, L.; Merbach, A. E.; Tóth, É. *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*; 2013.
- (43) Dubois, P. Historique de l'imagerie en médecine nucléaire. *IRBM* **2009**, *30* (2), 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.irbm.2008.12.002>.
- (44) Beyer, T.; Townsend, D. W.; Brun, T.; Kinahan, P. E.; Charron, M.; Roddy, R.; Jerin, J.; Young, J.; Byars, L.; Nutt, R. A Combined PET/CT Scanner for Clinical Oncology. *J Nucl Med* **2000**, *41* (8), 1369–1379.
- (45) de Dreuille, O.; Maszelin, P.; Foehrenbach, H.; Bonardel, G.; Gaillard, J.-F. Principe et technique de la tomographie par émission de positons (TEP). *EMC - Radiologie* **2004**, *1* (1), 2–35. <https://doi.org/10.1016/j.emcrad.2003.12.001>.
- (46) Noyaux et Particules. <https://Cosmologie.Wordpress.Com/Subatomique/Protons-et-Neutrons/Accelerateurs/> (Consulté le 20/05/2020).
- (47) Li, Z.; Conti, P. S. Radiopharmaceutical Chemistry for Positron Emission Tomography. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62* (11), 1031–1051. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.09.007>.
- (48) Wei, W.; Rosenkrans, Z. T.; Liu, J.; Huang, G.; Luo, Q.-Y.; Cai, W. ImmunoPET: Concept, Design, and Applications. *Chem. Rev.* **2020**, *120* (8), 3787–3851. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00738>.
- (49) La, M. T.; Tran, V. H.; Kim, H.-K. Progress of Coordination and Utilization of Zirconium-89 for Positron Emission Tomography (PET) Studies. *Nucl. Med. Mol. Imaging* **2019**, *53* (2), 115–124. <https://doi.org/10.1007/s13139-019-00584-z>.
- (50) Bailly, C.; Gouard, S.; Guérard, F.; Chalopin, B.; Carlier, T.; Faivre-Chauvet, A.; Remaud-Le Saëc, P.; Bourgeois, M.; Chouin, N.; Rbah-Vidal, L.; Tripier, R.; Haddad, F.; Kraeber-Bodéré, F.; Bodet-Milin, C.; Chérel, M. What Is the Best Radionuclide for Immuno-PET of Multiple Myeloma? A Comparison Study Between ^{89}Zr - and ^{64}Cu -Labeled Anti-CD138 in a Preclinical Syngeneic Model. *IJMS* **2019**, *20* (10), 2564. <https://doi.org/10.3390/ijms20102564>.

- (51) Raavé, R.; Sandker, G.; Adumeau, P.; Jacobsen, C. B.; Mangin, F.; Meyer, M.; Moreau, M.; Bernhard, C.; Da Costa, L.; Dubois, A.; Goncalves, V.; Gustafsson, M.; Rijpkema, M.; Boerman, O.; Chambron, J.-C.; Heskamp, S.; Denat, F. Direct Comparison of the in Vitro and in Vivo Stability of DFO, DFO* and DFOcyclo* for ^{89}Zr -ImmunoPET. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2019**, *46* (9), 1966–1977. <https://doi.org/10.1007/s00259-019-04343-2>.
- (52) Holland, J. P. Predicting the Thermodynamic Stability of Zirconium Radiotracers. *Inorg. Chem.* **2020**, *59* (3), 2070–2082. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b03515>.
- (53) Buchwalder, C.; Jaraquemada-Peláez, M. de G.; Rousseau, J.; Merkens, H.; Rodríguez-Rodríguez, C.; Orvig, C.; Bénard, F.; Schaffer, P.; Saatchi, K.; Häfeli, U. O. Evaluation of the Tetrakis(3-Hydroxy-4-Pyridinone) Ligand THPN with Zirconium(IV): Thermodynamic Solution Studies, Bifunctionalization, and in Vivo Assessment of Macromolecular ^{89}Zr -THPN-Conjugates. *Inorg. Chem.* **2019**, *58* (21), 14667–14681. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b02350>.
- (54) Ghosh, S. C.; Pinkston, K. L.; Robinson, H.; Harvey, B. R.; Wilganowski, N.; Gore, K.; Sevick-Muraca, E. M.; Azhdarinia, A. Comparison of DOTA and NODAGA as Chelators for ^{64}Cu -Labeled Immunoconjugates. *Nucl. Med. Biol.* **2015**, *42* (2), 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2014.09.009>.
- (55) Moreau, M.; Poty, S.; Vrigneaud, J.-M.; Walker, P.; Guillemin, M.; Raguin, O.; Oudot, A.; Bernhard, C.; Goze, C.; Boschetti, F.; Collin, B.; Brunotte, F.; Denat, F. MANOTA: A Promising Bifunctional Chelating Agent for Copper-64 ImmunoPET. *Dalton Trans.* **2017**, *46* (42), 14659–14668. <https://doi.org/10.1039/C7DT01772C>.
- (56) Wadas, T. J.; Anderson, C. J. Radiolabeling of TETA- and CB-TE2A-Conjugated Peptides with Copper-64. *Nat. Protoc.* **2006**, *1* (6), 3062–3068. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.431>.
- (57) Ferdani, R.; Stigers, D. J.; Fiamengo, A. L.; Wei, L.; Li, B. T. Y.; Golen, J. A.; Rheingold, A. L.; Weisman, G. R.; Wong, E. H.; Anderson, C. J. Synthesis, Cu(II) Complexation, ^{64}Cu -Labeling and Biological Evaluation of Cross-Bridged Cyclam Chelators with Phosphonate Pendant Arms. *Dalton Trans.* **2012**, *41* (7), 1938–1950. <https://doi.org/10.1039/C1DT11743B>.
- (58) David, T.; Kubíček, V.; Gutten, O.; Lubal, P.; Kotek, J.; Pietzsch, H.-J.; Rulíšek, L.; Hermann, P. Cyclam Derivatives with a Bis(Phosphinate) or a Phosphinato–Phosphonate Pendant Arm: Ligands for Fast and Efficient Copper(II) Complexation for Nuclear Medical Applications. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (24), 11751–11766. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b01791>.
- (59) Frindel, M.; Camus, N.; Rauscher, A.; Bourgeois, M.; Alliot, C.; Barré, L.; Gestin, J.-F.; Tripier, R.; Faivre-Chauvet, A. Radiolabeling of HTE1PA: A New Monopicolinate Cyclam Derivative for Cu-64 Phenotypic Imaging. In Vitro and in Vivo Stability Studies in Mice. *Nuc. Med. Biol.* **2014**, *41*, e49–e57. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2013.12.009>.
- (60) Navarro, A.-S.; Le Bihan, T.; Le Saëc, P.; Bris, N. L.; Bailly, C.; Saï-Maurel, C.; Bourgeois, M.; Chérel, M.; Tripier, R.; Faivre-Chauvet, A. TE1PA as Innovating Chelator for ^{64}Cu Immuno-TEP Imaging: A Comparative in Vivo Study with DOTA/NOTA by Conjugation on 9E7.4 MAb in a Syngeneic Multiple Myeloma

- Model. *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30* (9), 2393–2403.
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00510>.
- (61) Di Bartolo, N.; Sargeson, A. M.; Smith, S. V. New ^{64}Cu PET Imaging Agents for Personalised Medicine and Drug Development Using the Hexa-Aza Cage, SarAr. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4* (17), 3350. <https://doi.org/10.1039/b605615f>.
- (62) Singh, G.; Zarschler, K.; Hunoldt, S.; Martínez, I. I. S.; Ruehl, C. L.; Matterna, M.; Bergmann, R.; Máthé, D.; Hegedüs, N.; Bachmann, M.; Comba, P.; Stephan, H. Versatile Bispidine-Based Bifunctional Chelators for $^{64}\text{Cu}^{\text{II}}$ -Labelling of Biomolecules. *Chem. Eur. J.* **2020**, *26* (9), 1989–2001.
<https://doi.org/10.1002/chem.201904654>.
- (63) Hernandez, R.; Walker, K. L.; Grudzinski, J. J.; Aluicio-Sarduy, E.; Patel, R.; Zahm, C. D.; Pinchuk, A. N.; Massey, C. F.; Bitton, A. N.; Brown, R. J.; Sondel, P. M.; Morris, Z. S.; Engle, J. W.; Capitini, C. M.; Weichert, J. P. ^{90}Y -NM600 Targeted Radionuclide Therapy Induces Immunologic Memory in Syngeneic Models of T-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *Commun Biol* **2019**, *2* (1), 79. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0327-4>.
- (64) Ikotun, O. F.; Lapi, S. E. The Rise of Metal Radionuclides in Medical Imaging: Copper-64, Zirconium-89 and Yttrium-86. *Future Med. Chem.* **2011**, *3* (5), 599–621.
<https://doi.org/10.4155/fmc.11.14>.
- (65) Nayak, T. K.; Regino, C. A. S.; Wong, K. J.; Milenic, D. E.; Garmestani, K.; Baidoo, K. E.; Szajek, L. P.; Brechbiel, M. W. PET Imaging of HER1-Expressing Xenografts in Mice with ^{86}Y -CHX-A"-DTPA-Cetuximab. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2010**, *37* (7), 1368–1376. <https://doi.org/10.1007/s00259-009-1370-z>.
- (66) Chakravarty, R.; Goel, S.; Valdovinos, H. F.; Hernandez, R.; Hong, H.; Nickles, R. J.; Cai, W. Matching the Decay Half-Life with the Biological Half-Life: ImmunoPET Imaging with ^{44}Sc -Labeled Cetuximab Fab Fragment. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25* (12), 2197–2204. <https://doi.org/10.1021/bc500415x>.
- (67) Li, L.; Jaraquemada-Peláez, M. de G.; Aluicio-Sarduy, E.; Wang, X.; Jiang, D.; Sakheie, M.; Kuo, H.-T.; Barnhart, T. E.; Cai, W.; Radchenko, V.; Schaffer, P.; Lin, K.-S.; Engle, J. W.; Bénard, F.; Orvig, C. [$^{nat/44}\text{Sc}(\text{Pypa})$] $^-$: Thermodynamic Stability, Radiolabeling, and Biodistribution of a Prostate-Specific-Membrane-Antigen-Targeting Conjugate. *Inorg. Chem.* **2020**, *59* (3), 1985–1995.
<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b03347>.
- (68) Vaughn, B. A.; Ahn, S. H.; Aluicio-Sarduy, E.; Devaraj, J.; Olson, A. P.; Engle, J.; Boros, E. Chelation with a Twist: A Bifunctional Chelator to Enable Room Temperature Radiolabeling and Targeted PET Imaging with Scandium-44. *Chem. Sci.* **2020**, *11* (2), 333–342. <https://doi.org/10.1039/C9SC04655K>.
- (69) Wilson, C. B.; Snook, D. E.; Dhokia, B.; Taylor, C. V. J.; Watson, I. A.; Lammertsma, A. A.; Lambrecht, R.; Waxman, J.; Jones, T.; Epenetos, A. A. Quantitative Measurement of Monoclonal Antibody Distribution and Blood Flow Using Positron Emission Tomography And ^{124}I iodine in Patients with Breast Cancer. *Int. J. Cancer* **1991**, *47* (3), 344–347. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910470305>.
- (70) Bailey, G. S. The Iodogen Method for Radiolabeling Protein. In *The Protein Protocols Handbook*; Walker, J. M., Ed.; Springer Protocols Handbooks; Humana Press: Totowa, NJ, **1996**, 673–674. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-259-9_115.

- (71) Morsing, A.; Hildebrandt, M. G.; Vilstrup, M. H.; Wallenius, S. E.; Gerke, O.; Petersen, H.; Johansen, A.; Andersen, T. L.; Høilund-Carlsen, P. F. Hybrid PET/MRI in Major Cancers: A Scoping Review. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2019**, *46* (10), 2138–2151. <https://doi.org/10.1007/s00259-019-04402-8>.
- (72) Ehman, E. C.; Johnson, G. B.; Villanueva-Meyer, J. E.; Cha, S.; Leynes, A. P.; Larson, P. E. Z.; Hope, T. A. PET/MRI: Where Might It Replace PET/CT? *J Magn Reson Imaging* **2017**, *46* (5), 1247–1262. <https://doi.org/10.1002/jmri.25711>.
- (73) Chan, S.-C. Clinical Utility of Simultaneous Whole-Body ¹⁸F-FDG PET/MRI as a Single-Step Imaging Modality in the Staging of Primary Nasopharyngeal Carcinoma. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2018** *45*, 1297–1308. <https://doi.org/10.1007/s00259-018-3986-3>.
- (74) O’Neal, S. L.; Zheng, W. Manganese Toxicity Upon Overexposure: A Decade in Review. *Curr. Envir. Health Rpt* **2015**, *2* (3), 315–328. <https://doi.org/10.1007/s40572-015-0056-x>.
- (75) Drahoš, B.; Lukeš, I.; Tóth, É. Manganese(II) Complexes as Potential Contrast Agents for MRI. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, *2012* (12), 1975–1986. <https://doi.org/10.1002/ejic.201101336>.
- (76) Botta, M.; Carniato, F.; Esteban-Gómez, D.; Platas-Iglesias, C.; Tei, L. Mn(II) Compounds as an Alternative to Gd-Based MRI Probes. *Future Med. Chem.* **2019**, *11* (12), 1461–1483. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0608>.
- (77) Wahsner, J.; Gale, E. M.; Rodríguez-Rodríguez, A.; Caravan, P. Chemistry of MRI Contrast Agents: Current Challenges and New Frontiers. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (2), 957–1057. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00363>.
- (78) Rolla, G. A.; Platas-Iglesias, C.; Botta, M.; Tei, L.; Helm, L. ¹H and ¹⁷O NMR Relaxometric and Computational Study on Macrocyclic Mn(II) Complexes. *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (6), 3268–3279. <https://doi.org/10.1021/ic302785m>.
- (79) Aime, S.; Anelli, P.; Botta, M.; Brocchetta, M.; Canton, S.; Fedeli, F.; Gianolio, E.; Terreno, E. Relaxometric Evaluation of Novel Manganese(II) Complexes for Application as Contrast Agents in Magnetic Resonance Imaging. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2002**, *7* (1–2), 58–67. <https://doi.org/10.1007/s007750100265>.
- (80) Troughton, J. S.; Greenfield, M. T.; Greenwood, J. M.; Dumas, S.; Wiethoff, A. J.; Wang, J.; Spiller, M.; McMurry, T. J.; Caravan, P. Synthesis and Evaluation of a High Relaxivity Manganese(II)-Based MRI Contrast Agent. *Inorg. Chem.* **2004**, *43* (20), 6313–6323. <https://doi.org/10.1021/ic049559g>.
- (81) Caravan, P.; Parigi, G.; Chasse, J. M.; Cloutier, N. J.; Ellison, J. J.; Lauffer, R. B.; Luchinat, C.; McDermid, S. A.; Spiller, M.; McMurry, T. J. Albumin Binding, Relaxivity, and Water Exchange Kinetics of the Diastereoisomers of MS-325, a Gadolinium(III)-Based Magnetic Resonance Angiography Contrast Agent. *Inorg. Chem.* **2007**, *46* (16), 6632–6639. <https://doi.org/10.1021/ic700686k>.
- (82) Zhang, Q.; Gorden, J. D.; Beyers, R. J.; Goldsmith, C. R. Manganese(II)-Containing MRI Contrast Agent Employing a Neutral and Non-Macrocyclic Ligand. *Inorg. Chem.* **2011**, *50* (19), 9365–9373. <https://doi.org/10.1021/ic2009495>.
- (83) Gale, E. M.; Mukherjee, S.; Liu, C.; Loving, G. S.; Caravan, P. Structure–Redox–Relaxivity Relationships for Redox Responsive Manganese-Based Magnetic Resonance

- Imaging Probes. *Inorg. Chem.* **2014**, *53* (19), 10748–10761.
<https://doi.org/10.1021/ic502005u>.
- (84) Kálmán, F. K.; Tircsó, G. Kinetic Inertness of the Mn²⁺ Complexes Formed with AAZTA and Some Open-Chain EDTA Derivatives. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (19), 10065–10067. <https://doi.org/10.1021/ic300832e>.
- (85) Gale, E. M.; Atanasova, I. P.; Blasi, F.; Ay, I.; Caravan, P. A Manganese Alternative to Gadolinium for MRI Contrast. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (49), 15548–15557. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b10748>.
- (86) Gale, E. M.; Wey, H.-Y.; Ramsay, I.; Yen, Y.-F.; Sosnovik, D. E.; Caravan, P. A Manganese-Based Alternative to Gadolinium: Contrast-Enhanced MR Angiography, Excretion, Pharmacokinetics, and Metabolism. *Radiology* **2018**, *286* (3), 865–872. <https://doi.org/10.1148/radiol.2017170977>.
- (87) Wang, J.; Wang, H.; Ramsay, I. A.; Erstad, D. J.; Fuchs, B. C.; Tanabe, K. K.; Caravan, P.; Gale, E. M. Manganese-Based Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging of Liver Tumors: Structure–Activity Relationships and Lead Candidate Evaluation. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (19), 8811–8824. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00964>.
- (88) Pota, K.; Garda, Z.; Kálmán, F. K.; Barriada, J. L.; Esteban-Gómez, D.; Platas-Iglesias, C.; Tóth, I.; Brücher, E.; Tircsó, G. Taking the next Step toward Inert Mn²⁺ Complexes of Open-Chain Ligands: The Case of the Rigid PhDTA Ligand. *New J. Chem.* **2018**, *42* (10), 8001–8011. <https://doi.org/10.1039/C8NJ00121A>.
- (89) Forgács, A.; Regueiro-Figueroa, M.; Barriada, J. L.; Esteban-Gómez, D.; de Blas, A.; Rodríguez-Blas, T.; Botta, M.; Platas-Iglesias, C. Mono-, Bi-, and Trinuclear Bis-Hydrated Mn²⁺ Complexes as Potential MRI Contrast Agents. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (19), 9576–9587. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b01677>.
- (90) Tei, L.; Gugliotta, G.; Fekete, M.; Kálmán, F. K.; Botta, M. Mn(II) Complexes of Novel Hexadentate AAZTA-like Chelators: A Solution Thermodynamics and Relaxometric Study. *Dalton Trans.* **2011**, *40* (9), 2025. <https://doi.org/10.1039/c0dt01114b>.
- (91) Aime, S.; Calabi, L.; Cavallotti, C.; Gianolio, E.; Giovenzana, G. B.; Losi, P.; Maiocchi, A.; Palmisano, G.; Sisti, M. [Gd-AAZTA]⁻: A New Structural Entry for an Improved Generation of MRI Contrast Agents. *Inorg. Chem.* **2004**, *43* (24), 7588–7590. <https://doi.org/10.1021/ic0489692>.
- (92) Anbu, S.; Hoffmann, S. H. L.; Carniato, F.; Kenning, L.; Price, T. W.; Prior, T. J.; Botta, M.; Martins, A. F.; Stasiuk, G. J. A Single-Pot Template Reaction Towards a Manganese-Based T₁ Contrast Agent. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60* (19), 10736–10744. <https://doi.org/10.1002/anie.202100885>.
- (93) Rolla, G. A.; Platas-Iglesias, C.; Botta, M.; Tei, L.; Helm, L. ¹H and ¹⁷O NMR Relaxometric and Computational Study on Macrocyclic Mn(II) Complexes. *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (6), 3268–3279. <https://doi.org/10.1021/ic302785m>.
- (94) Forgács, A.; Tei, L.; Baranyai, Z.; Esteban-Gómez, D.; Platas-Iglesias, C.; Botta, M. Optimising the Relaxivities of Mn²⁺ Complexes by Targeting Human Serum Albumin (HSA). *Dalton Trans.* **2017**, *46* (26), 8494–8504. <https://doi.org/10.1039/C7DT01508A>.
- (95) Geraldés, C. F. G. C.; Sherry, A. D.; Brown, R. D.; Koenig, S. H. Magnetic Field Dependence of Solvent Proton Relaxation Rates Induced by Gd³⁺ and Mn²⁺

- Complexes of Various Polyaza Macrocyclic Ligands: Implications for NMR Imaging. *Magn. Reson. Med.* **1986**, *3* (2), 242–250. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910030207>.
- (96) Balogh, E.; He, Z.; Hsieh, W.; Liu, S.; Tóth, É. Dinuclear Complexes Formed with the Triazacyclononane Derivative ENOTA⁴⁻: High-Pressure ¹⁷O NMR Evidence of an Associative Water Exchange on [Mn^{II}₂(ENOTA)(H₂O)₂]. *Inorg. Chem.* **2007**, *46* (1), 238–250. <https://doi.org/10.1021/ic0616582>.
- (97) Drahoš, B.; Pniok, M.; Havlíčková, J.; Kotek, J.; Císařová, I.; Hermann, P.; Lukeš, I.; Tóth, É. Mn²⁺ Complexes of 1-Oxa-4,7-Diazacyclononane Based Ligands with Acetic, Phosphonic and Phosphinic Acid Pendant Arms: Stability and Relaxation Studies. *Dalton Trans.* **2011**, *40* (39), 10131. <https://doi.org/10.1039/c1dt10543d>.
- (98) Drahoš, B.; Kotek, J.; Císařová, I.; Hermann, P.; Helm, L.; Lukeš, I.; Tóth, É. Mn²⁺ Complexes with 12-Membered Pyridine Based Macrocycles Bearing Carboxylate or Phosphonate Pendant Arm: Crystallographic, Thermodynamic, Kinetic, Redox, and ¹H/¹⁷O Relaxation Studies. *Inorg. Chem.* **2011**, *50* (24), 12785–12801. <https://doi.org/10.1021/ic201935r>.
- (99) Botár, R.; Molnár, E.; Trencsényi, G.; Kiss, J.; Kálmán, F. K.; Tircsó, G. Stable and Inert Mn(II)-Based and PH-Responsive Contrast Agents. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (4), 1662–1666. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b09407>.
- (100) Kálmán, F. K.; Nagy, V.; Váradi, B.; Garda, Z.; Molnár, E.; Trencsényi, G.; Kiss, J.; Mème, S.; Mème, W.; Tóth, É.; Tircsó, G. Mn(II)-Based MRI Contrast Agent Candidate for Vascular Imaging. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (11), 6057–6065. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00197>.
- (101) Drahoš, B.; Kotek, J.; Hermann, P.; Lukeš, I.; Tóth, É. Mn²⁺ Complexes with Pyridine-Containing 15-Membered Macrocycles: Thermodynamic, Kinetic, Crystallographic, and ¹H/¹⁷O Relaxation Studies. *Inorg. Chem.* **2010**, *49* (7), 3224–3238. <https://doi.org/10.1021/ic9020756>.
- (102) Von Stenhouse, J. Ueber die Wirkung von Salpetersäure auf verschiedene Vegetabilien, nebst einer näheren Untersuchung von Spartium Scorparium. *Linn. Ann. Chem. Pharm.* **1851**, *78* (1), 1–30. <https://doi.org/10.1002/jlac.18510780102>.
- (103) Mannich, C.; Mohs, P. Über Derivate eines aus zwei Piperidinringen kondensierten bicyclischen Systems. *Ber. Dtsch. Chem. Ges. A/B* **1930**, *63* (3), 608–612. <https://doi.org/10.1002/cber.19300630314>.
- (104) Haller, R.; Unholzer, H. Zur Stereochemie von 3-Oxa-7-aza- und 3,7-Diaza-bicyclo[3,3,1]-nonanon. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1972**, *305* (11), 855–863. <https://doi.org/10.1002/ardp.19723051112>.
- (105) Caujolle, R.; Lattes, A.; Jaud, J.; Galy, J. Structure de La Bispidone (Hydroxy-2 Éthyl)-3 Oxo-9 Phénéthyl-7 Diphényl-6,8 Diaza-3,7 Bicyclo[3.3.1]Nonanedicarboxylate-1,5 de Diméthyle. *Acta Crystallogr B Struct Sci* **1981**, *37* (9), 1699–1703. <https://doi.org/10.1107/S0567740881006924>.
- (106) Borsodi, A.; Benyhe, S.; Holzgrabe, U.; Márki, Á.; Nachtsheim, C. Structurally Novel Group of Ligands Selective for Kappa Opioid Receptors. *Regul. Pept.* **1994**, *54* (1), 27–28. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(94\)90372-7](https://doi.org/10.1016/0167-0115(94)90372-7).
- (107) Kögel, B.; Christoph, T.; Friderichs, E.; Hennies, H.-H.; Matthiesen, T.; Schneider, J.; Holzgrabe, U. HZ2, a Selective Kappa-Opioid Agonist. *CNS Drug Reviews* **1998**, *4* (1), 54–70. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.1998.tb00041.x>.

- (108) Comba, P.; Kerscher, M.; Schiek, W. Bispidine Coordination Chemistry. In *Progress in Inorganic Chemistry*; Karlin, K. D., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2008; pp 613–704. <https://doi.org/10.1002/9780470144428.ch9>.
- (109) Comba, P.; Kerscher, M.; Rück, K.; Starke, M. Bispidines for Radiopharmaceuticals. *Dalton Trans.* **2018**, 47 (28), 9202–9220. <https://doi.org/10.1039/C8DT01108G>.
- (110) Comba, P.; Wadepohl, H.; Wiesner, S. Optimization of the Efficiency of Oxidation Catalysts Based on Iron Bispidine Complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2011**, 2011 (16), 2610–2615. <https://doi.org/10.1002/ejic.201100212>.
- (111) Comba, P.; Morgen, M.; Wadepohl, H. Tuning of the Properties of Transition-Metal Bispidine Complexes by Variation of the Basicity of the Aromatic Donor Groups. *Inorg. Chem.* **2013**, 52 (11), 6481–6501. <https://doi.org/10.1021/ic4004214>.
- (112) Werkmeister, S.; Neumann, J.; Junge, K.; Beller, M. Pincer-Type Complexes for Catalytic (De)Hydrogenation and Transfer (De)Hydrogenation Reactions: Recent Progress. *Chem. Eur. J.* **2015**, 21 (35), 12226–12250. <https://doi.org/10.1002/chem.201500937>.
- (113) Nonat, A. M.; Roux, A.; Sy, M.; Charbonnière, L. J. 2,4-Substituted Bispidines as Rigid Hosts for Versatile Applications: From κ -Opioid Receptor to Metal Coordination. *Dalton Trans.* **2019**, 48 (44), 16476–16492. <https://doi.org/10.1039/C9DT03480C>.
- (114) Juran, S.; Walther, M.; Stephan, H.; Bergmann, R.; Steinbach, J.; Kraus, W.; Emmerling, F.; Comba, P. Hexadentate Bispidine Derivatives as Versatile Bifunctional Chelate Agents for Copper(II) Radioisotopes. *Bioconjugate Chemistry* **2009**, 20 (2), 347–359. <https://doi.org/10.1021/bc800461e>.
- (115) Roux, A.; Gillet, R.; Huclier-Markai, S.; Ehret-Sabatier, L.; Charbonnière, L. J.; Nonat, A. M. Bifunctional Bispidine Derivatives for Copper-64 Labelling and Positron Emission Tomography. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 15 (6), 1475–1483. <https://doi.org/10.1039/C6OB02712A>.
- (116) Gillet, R.; Roux, A.; Brandel, J.; Huclier-Markai, S.; Camerel, F.; Jeannin, O.; Nonat, A. M.; Charbonnière, L. J. A Bispidol Chelator with a Phosphonate Pendant Arm: Synthesis, Cu(II) Complexation, and ^{64}Cu Labeling. *Inorg. Chem.* **2017**, 56 (19), 11738–11752. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b01731>.
- (117) Comba, P.; Hunoldt, S.; Morgen, M.; Pietzsch, J.; Stephan, H.; Wadepohl, H. Optimization of Pentadentate Bispidines as Bifunctional Chelators for ^{64}Cu Positron Emission Tomography (PET). *Inorg. Chem.* **2013**, 52(14), 8131–8143. <https://doi.org/10.1021/ic4008685>.
- (118) Comba, P.; Kubeil, M.; Pietzsch, J.; Rudolf, H.; Stephan, H.; Zarschler, K. Bispidine Dioxotetraaza Macrocycles: A New Class of Bispidines for ^{64}Cu PET Imaging. *Inorg. Chem.* **2014**, 53 (13), 6698–6707. <https://doi.org/10.1021/ic500476u>.
- (119) Stephan, H.; Walther, M.; Fähnemann, S.; Ceroni, P.; Molloy, J. K.; Bergamini, G.; Heisig, F.; Müller, C. E.; Kraus, W.; Comba, P. Bispidines for Dual Imaging. *Chem. Eur. J.* **2014**, 20 (51), 17011–17018. <https://doi.org/10.1002/chem.201404086>.
- (120) Blower, P. J. A Nuclear Chocolate Box: The Periodic Table of Nuclear Medicine. *Dalton Trans.* **2015**, 44 (11), 4819–4844. <https://doi.org/10.1039/C4DT02846E>.
- (121) Comba, P.; Jermilova, U.; Orvig, C.; Patrick, B. O.; Ramogida, C. F.; Rück, K.; Schneider, C.; Starke, M. Octadentate Picolinic Acid-Based Bispidine Ligand for

- Radiometal Ions. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23* (63), 15945–15956. <https://doi.org/10.1002/chem.201702284>.
- (122) Choudhary, N.; Dimmling, A.; Wang, X.; Southcott, L.; Radchenko, V.; Patrick, B. O.; Comba, P.; Orvig, C. Octadentate Oxine-Armed Bispidine Ligand for Radiopharmaceutical Chemistry. *Inorg. Chem.* **2019**, *58* (13), 8685–8693. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b01016>.
- (123) Bruchertseifer, F.; Comba, P.; Martin, B.; Morgenstern, A.; Notni, J.; Starke, M.; Wadepohl, H. First-Generation Bispidine Chelators for $^{213}\text{Bi}^{\text{III}}$ Radiopharmaceutical Applications. *ChemMedChem* **2020**, *15* (16), 1591–1600. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000361>.
- (124) Price, T. W.; Yap, S. Y.; Gillet, R.; Savoie, H.; Charbonnière, L. J.; Boyle, R. W.; Nonat, A. M.; Stasiuk, G. J. Evaluation of a Bispidine-Based Chelator for Gallium-68 and of the Porphyrin Conjugate as PET/PDT Theranostic Agent. *Chem. Eur. J.* **2020**, *26* (34), 7602–7608. <https://doi.org/10.1002/chem.201905776>.
- (125) Šimeček, J.; Schulz, M.; Notni, J.; Plutnar, J.; Kubíček, V.; Havlíčková, J.; Hermann, P. Complexation of Metal Ions with TRAP (1,4,7-Triazacyclononane Phosphinic Acid) Ligands and 1,4,7-Triazacyclononane-1,4,7-Triacetic Acid: Phosphinate-Containing Ligands as Unique Chelators for Trivalent Gallium. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (1), 577–590. <https://doi.org/10.1021/ic202103v>.
- (126) Price, T. W.; Yap, S. Y.; Gillet, R.; Savoie, H.; Charbonnière, L. J.; Boyle, R. W.; Nonat, A. M.; Stasiuk, G. J. Evaluation of a Bispidine-Based Chelator for Gallium-68 and of the Porphyrin Conjugate as PET/PDT Theranostic Agent. *Chem. Eur. J.* **2020**, *26* (34), 7602–7608. <https://doi.org/10.1002/chem.201905776>.
- (127) Comba, P.; Nuber, B.; Ramlow, A. The Design of a New Type of Very Rigid Tetradentate Ligand. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1997**, No. 3, 347–352. <https://doi.org/10.1039/a603635j>.
- (128) Barman, P.; Upadhyay, P.; Faponle, A. S.; Kumar, J.; Nag, S. S.; Kumar, D.; Sastri, C. V.; de Visser, S. P. Deformylation Reaction by a Nonheme Manganese(III)-Peroxo Complex via Initial Hydrogen-Atom Abstraction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55* (37), 11091–11095. <https://doi.org/10.1002/anie.201604412>.
- (129) Rossetti, A.; Lippi, M.; Martí-Rujas, J.; Sacchetti, A.; Cametti, M. Highly Dynamic and Tunable Behavior of 1D Coordination Polymers Based on the Bispidine Ligand. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24* (72), 19368–19372. <https://doi.org/10.1002/chem.201804782>.

CHAPITRE II

Synthèse

1. Présentation des différentes voies synthétiques.

1.1. Schéma de rétrosynthèse.

Les bispidines précédemment présentées (Figure 1.69) seront synthétisées selon deux voies de synthèse différentes. La première correspond à la synthèse classique des bispidines présentée dans la partie précédente (Voie A, Figure 2.1). La seconde est celle initiée par le groupe de J. Hasseroth¹ qui passe par la protection de la bispidine avec un groupement 2,4-diméthoxybenzyle (DMB) (Voie B, Figure 2.1) et dont des adaptations successives ont été développées par l'équipe de P. Comba² et au laboratoire. Cette voie permet d'accéder à des plateformes « universelles » sur lesquelles différents bras coordinants pourront être ajoutés lors d'une alkylation par substitution nucléophile.

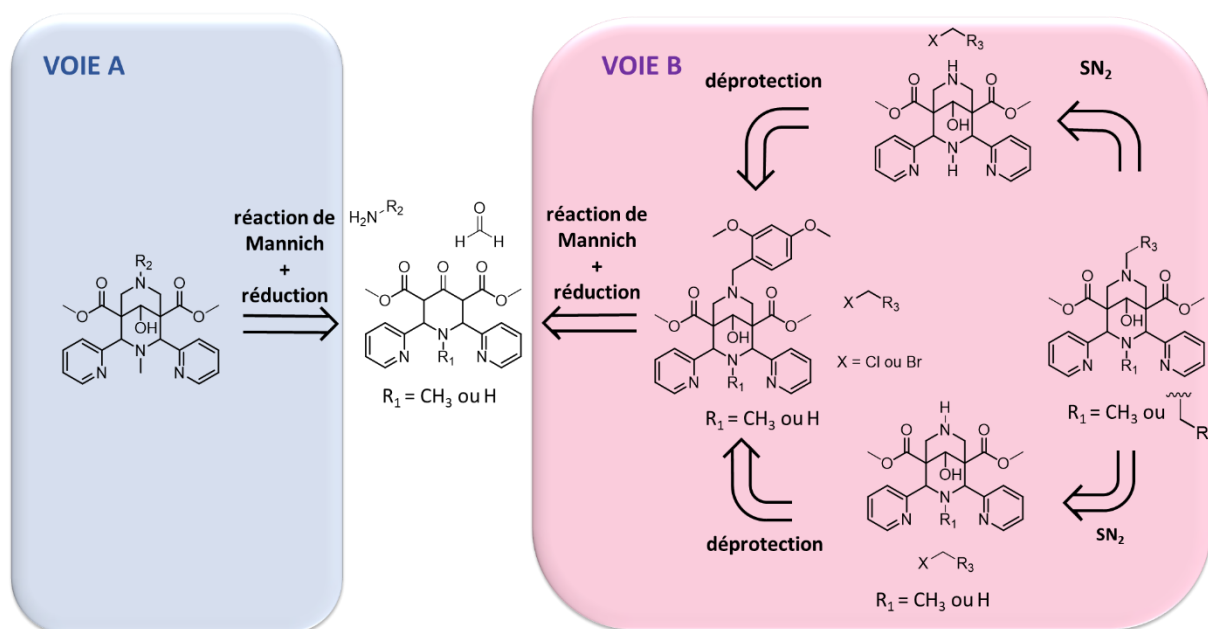


Figure 2.1 : Schéma de rétrosynthèse des bispidines par la voie classique (Voie A) et avec la 2,4-diméthoxybenzylamine (Voie B).

1.2. Synthèse des précurseurs **P₁** et **P₂**.

La synthèse des précurseurs **P₁** et **P₂** a été réalisée selon le protocole décrit par Legdali et al.³ Pour le précurseur **P₁**, la 2-pyridinecarboxaldéhyde, la méthylamine et l'acide 1,5-diméthyl-ester-3-oxo-pentanoïque ont été mélangés dans le méthanol à 0 °C (Figure 2.2).

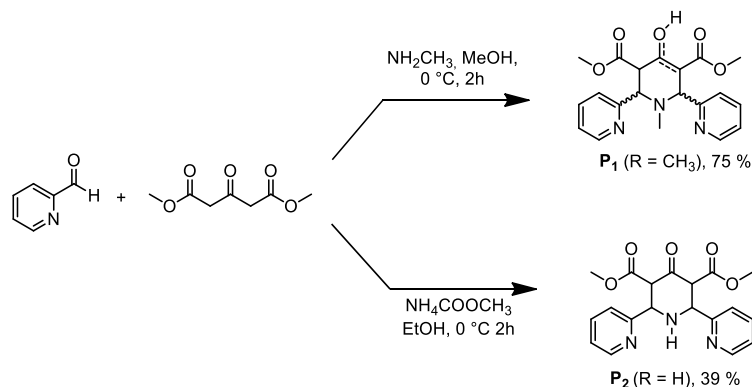


Figure 2.2 : Synthèse des précurseurs **P₁** et **P₂**.

A la fin de la réaction, un précipité est déjà observé mais le milieu réactionnel est laissé à 4 °C pendant une nuit afin de faciliter la précipitation. Le précipité a ensuite été recristallisé dans le méthanol et les différents isomères obtenus ont été identifiés par RMN ¹H. Le spectre est très complexe du fait de la formation de quatre isomères (trans-énol, cis-cétone, cis-énol et trans-cétone) selon la configuration (cis/trans des pyridines) et les formes tautomériques de l'équilibre céto-énolique. Néanmoins, les signaux des fonctions ester méthyliques, du méthyl en N3 et des hydrogènes des énols permettent d'attribuer les différentes espèces. De plus, lors d'une précédente réaction, le précipité obtenu en fin de réaction a été directement isolé et dans ce premier batch, la forme très majoritairement obtenue était la forme cis cétone (Figure 2.4, courbe rose). Cela a permis de clairement identifier l'espèce cis-cétone dans un batch présentant les quatre isomères. Ainsi, les proportions obtenues lors de cette réaction était de 53 % de trans-énol, 26% de cis-cétone, 16 % de cis émol et 5 % de trans-cétone.

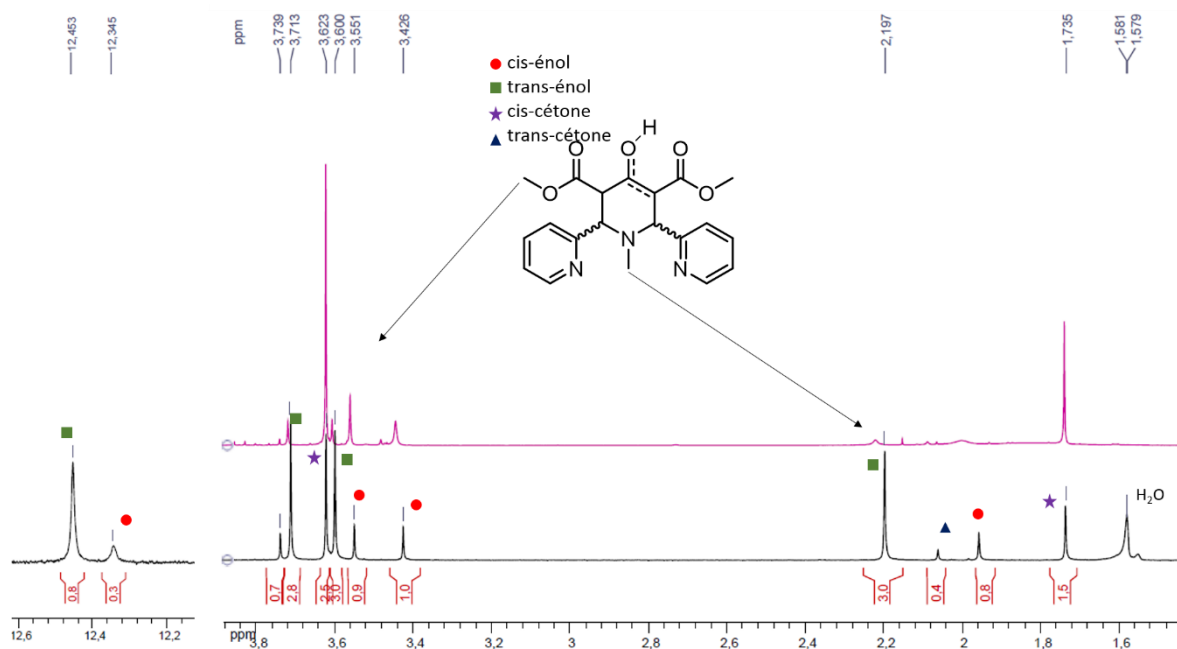


Figure 2.3 : Spectre RMN ^1H du précurseur \mathbf{P}_1 (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C).

Le précurseur \mathbf{P}_2 a été obtenu avec la même méthode que celle utilisée pour \mathbf{P}_1 , cependant, elle a été réalisée avec de l'acétate d'ammonium à la place de la méthylamine et dans l'éthanol (Figure 2.2). Le précipité obtenu a ensuite été recristallisé dans le MeOH et le précurseur \mathbf{P}_2 a finalement été isolé avec un rendement de 39 %. Du fait de l'absence d'encombrement stérique sur la position N3, seul la forme cis-cétone est obtenue.

1.3. Synthèse du squelette bispidol via l'utilisation de la 2,4-diméthoxybenzylamine.

Ces intermédiaires ont été synthétisés en adaptant le protocole de Comba *et al.*² Une double réaction de Mannich a été réalisée entre un précurseur (**P**₁ ou **P**₂), la 2,4-diméthoxybenzylamine et le formaldéhyde dans le THF à 65 °C. A la fin de la réaction, les composés **1** et **2** ont été isolés par précipitation dans le méthanol avec des rendements de 83 % et 69 % respectivement. Cette différence de rendement est principalement due au fait que le composé **1** précipite plus facilement que le composé **2** à cause de la fonction méthyle qui le rend plus apolaire. La cétone centrale des composés **1** et **2** a ensuite été réduite en présence de tétrahydroborate de sodium à -78 °C afin d'accéder aux composés **3** et **4** (Figure 2.4).

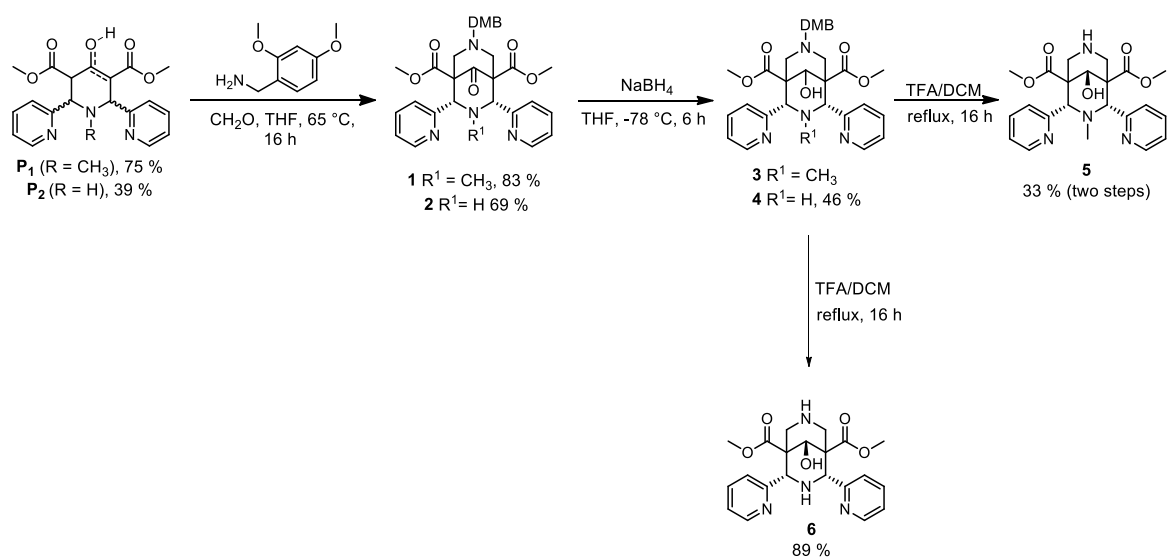


Figure 2.4 : Synthèse des composés **5** et **6**.

Une différence importante a été observée lors de la synthèse de ces deux composés. En effet, pour le composé **1**, avec l'amine secondaire en position N3, seul un isomère a été isolé et il s'agit de celui dont l'alcool pointe vers la position N3 (R¹). Cet isomère a pu être déterminé par spectroscopie NOESY où un couplage peut être observé entre l'hydrogène en position 9 et les hydrogène axiaux des positions 6 et 8 (Figure 2.6). La synthèse a alors été poursuivie en retirant le groupement 2,4-diméthoxybenzyl dans un mélange de DCM et TFA pour accéder au composé **6** avec un rendement de 89 % (Figure 2.4).

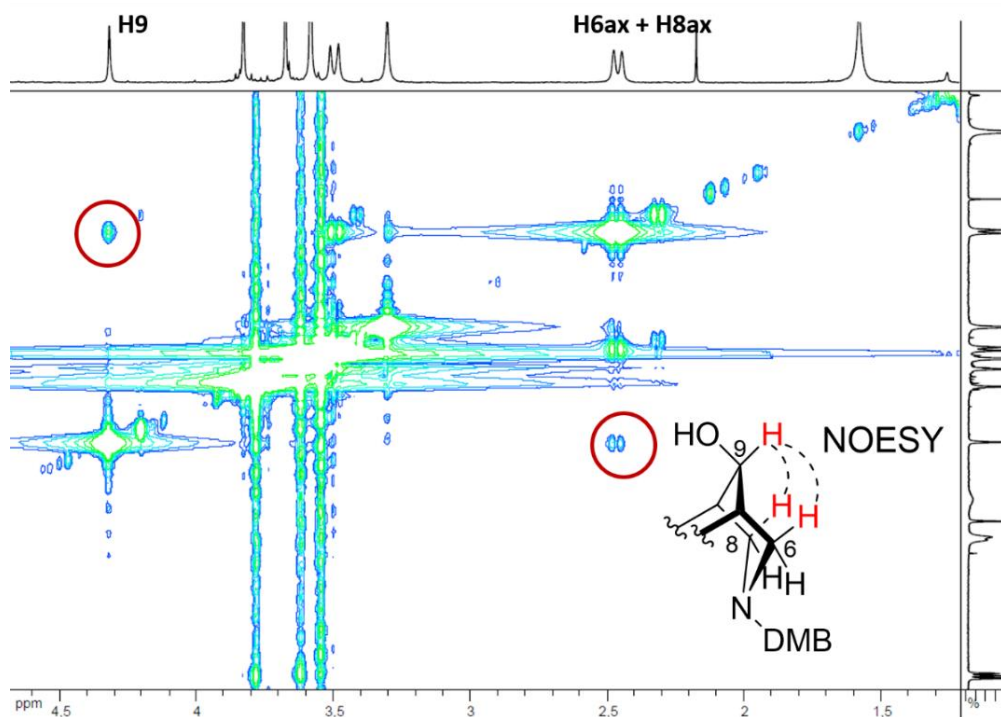


Figure 2.5 : Spectre RMN ^1H NOESY du composé **4** (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C).

Dans le cas de **3**, après purification du produit brut sur colonne chromatographique (SiO_2 , DCM/MeOH) deux espèces pouvaient être clairement distinguées par RMN. Les deux composés ne pouvant être séparés la synthèse a été poursuivie. Lors de l'étape de déprotection, deux taches très proches sont apparues sur CCM signifiant ainsi que ces deux composés pouvaient alors être séparés sur colonne chromatographique (SiO_2 , DCM/MeOH). Deux composés ont alors été isolés. L'analyse des spectres RMN et NOESY a permis de vérifier qu'il s'agissait des deux diastéréoisomères. En effet, le spectre NOESY de l'isomère 1 présente un couplage entre le proton 9 et les protons 6 et 8 axiaux ce qui signifie qu'il s'agit de l'isomère où l'alcool pointe vers l'azote en position N3 (Figure 2.6).

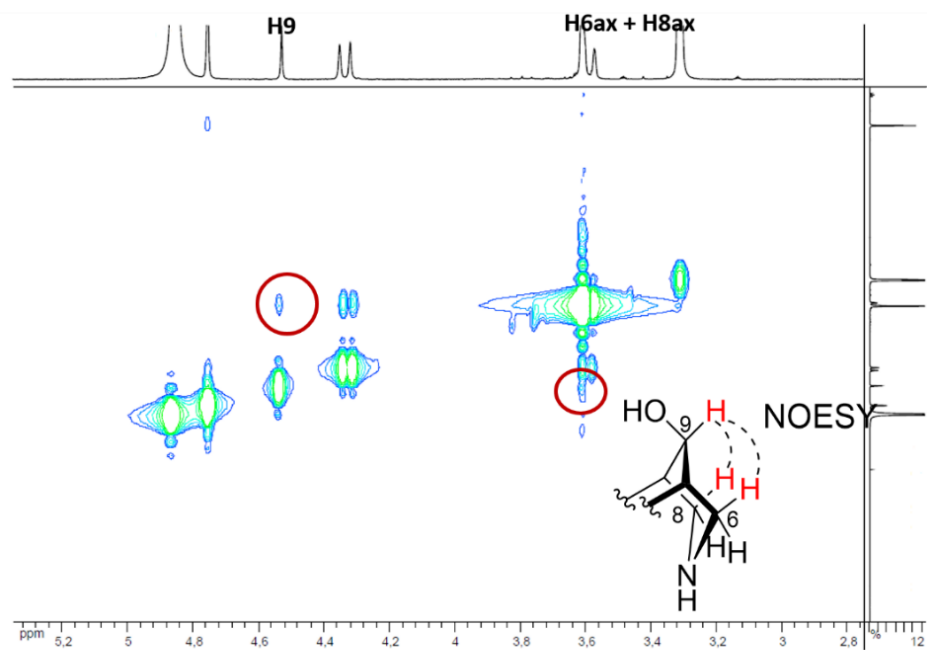


Figure 2.6 : Spectre RMN ^1H NOESY de l'isomère 1 (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C).

Le spectre NOESY de l'isomère 2 a montré un couplage entre le proton 9 et les protons 2 et 4 prouvant qu'il s'agit bien de l'autre diastéréoisomère (Figure 2.7). Pour les étapes de synthèse suivante, c'est l'isomère 1 a été utilisé car c'est le seul qui a été précédemment étudié.

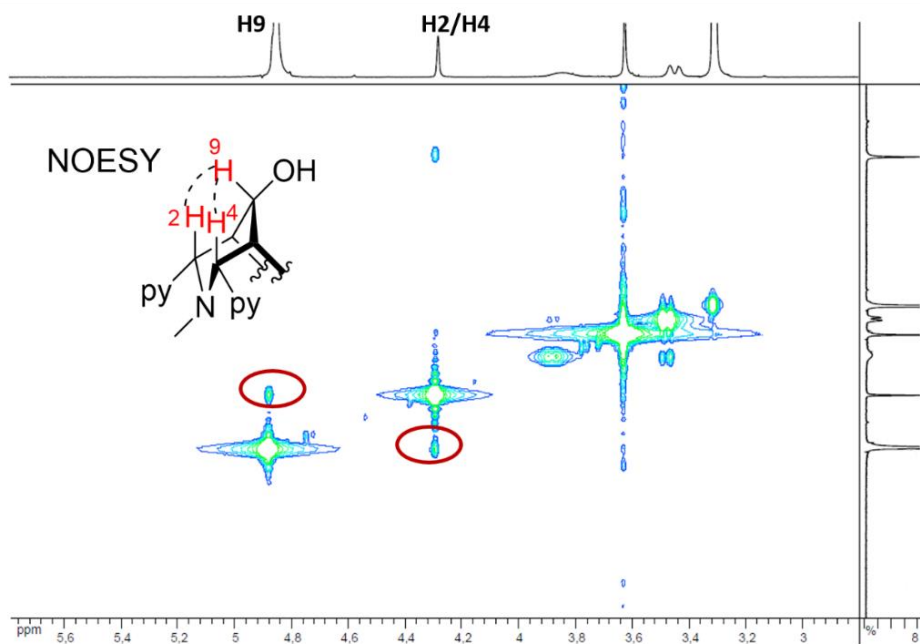


Figure 2.7 : Spectre RMN ^1H NOESY de l'isomère 2 (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C).

2. Synthèse des bispidines avec un bras dérivé des acides aminés.

La majorité des ligands de cette série contiennent une lysine et sont des analogues du ligand **L1**. Seul le ligand **L4** se distingue par un groupement glutamate. Tous ces ligands ont été obtenus en partant du précurseur **P1** via la voie classique de la synthèse des bispidines.

2.1. Synthèse du ligand **L1**.

Le ligand **L1** a été synthétisé d'après une voie de synthèse développée par Roux et al.⁴ et qui a été présentée dans l'introduction (Figure 1.43). Cependant, quelques adaptations ont été réalisées. Premièrement, dans le protocole initial, la bispidone **7** est précipitée par un ajout lent du milieu réactionnel (dissout dans un minimum de méthanol) dans un grand volume d'éther diéthylique. Cette méthode a été tentée plusieurs fois mais les impuretés précipitaient avec le produit. Le composé a finalement été isolé par précipitation dans l'acétonitrile où une poudre blanche a été obtenue avec un rendement de 54 %. Ensuite, les étapes de purification ont été réduites afin de limiter les pertes et une seule purification par FPLC (= Flash Purification Liquid Chromatography) a été réalisée en fin de synthèse. Le rendement global de la réaction est de 17 % (Figure 2.8) ce qui est proche du rendement du protocole original (18 %) mais ce nouveau protocole expérimental a l'avantage d'être plus reproductible. Finalement, 474 mg de ligand **L1** ont été obtenus et caractérisés par ESI-MS et analyse élémentaire ($C_{26}H_{33}N_5O_7 \cdot 2(CF_3COOH) \cdot 2(H_2O)$). L'étape limitante est la réduction de la cétone centrale et des optimisations pourraient être envisagées sur cette étape afin d'en améliorer la régiosélectivité faciale.

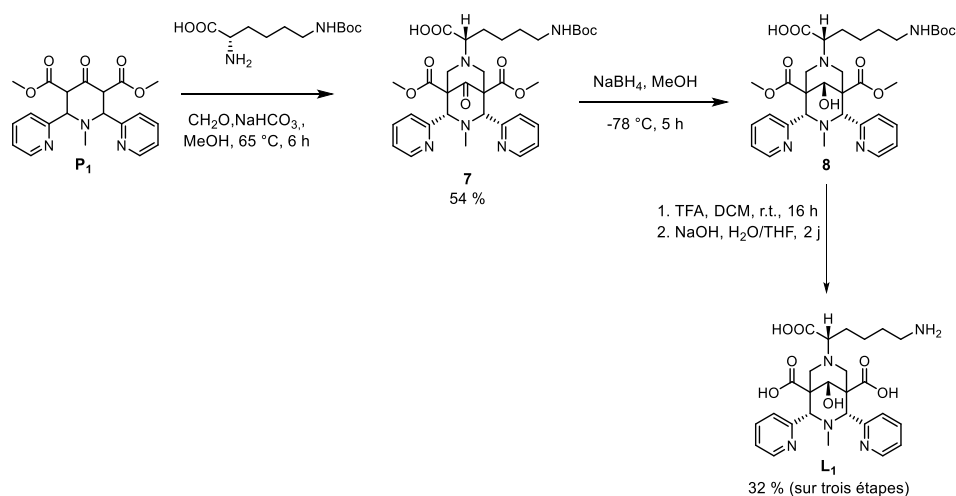


Figure 2.8 : Synthèse du ligand **L1**.

2.2. Synthèse du ligand **L2**.

Le ligand **L2** a été obtenu à partir de la bispidol **8**. Il a été synthétisé à l'échelle de 200 mg. Les esters méthyliques de **8** ont été réduits en présence de tétrahydroborate de lithium dans le THF à température ambiante. Le composé **9** a alors été isolé avec un rendement de 75 %. Ce dernier a ensuite été ajouté dans un mélange de TFA et DCM afin de retirer le groupement Boc pour finalement accéder au ligand **L2** ($C_{26}H_{37}N_5O_5 \cdot 3(CF_3COOH)$) avec un rendement de 68 % (160 mg) (Figure 2.9).

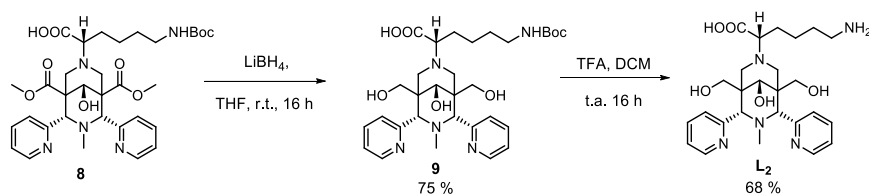


Figure 2.9 : Synthèse du ligand **L2**.

Le spectre RMN 1H de **9** est assez complexe (Figure 2.11). En effet, en plus des systèmes AB des protons 6 et 8 habituellement présent sur le squelette, les deux CH_2 issus de la réduction forment aussi un système AB. L'attribution des pics a pu être réalisée en analysant les spectres NOESY (Figure 2.11), COSY et HSQC. Il est entendu que, du fait du carbone asymétrique de la lysine, la molécule ne possède pas de plan de symétrie. Néanmoins, la numérotation de la Figure 2.10 a été allégée pour des raisons de clarté et de lisibilité dans l'annotation du spectre RMN. Ce même type de numérotation a été conservé pour la suite.

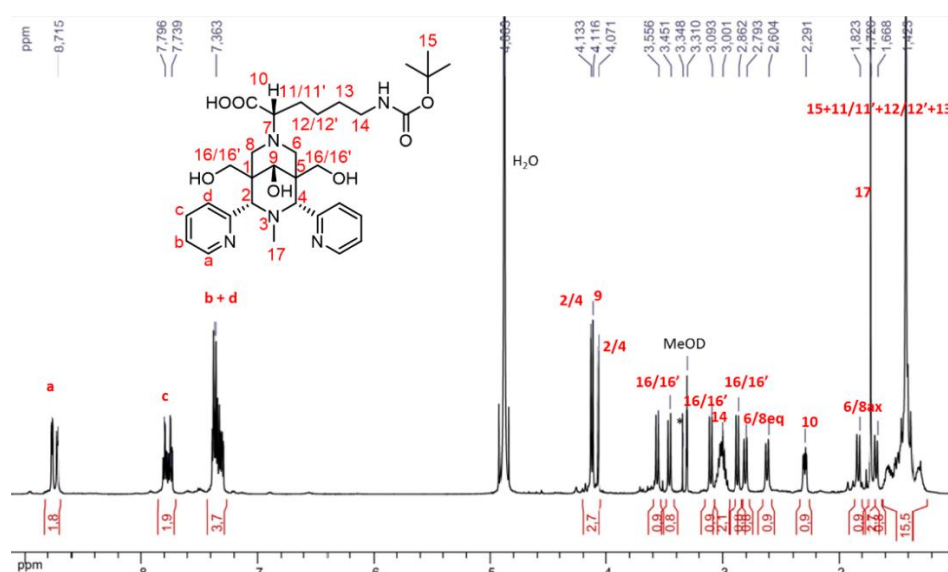


Figure 2.10 : Spectre RMN 1H du bispidol **9** (500 MHz, MeOD, 25 °C), *MeOH.

Un déplacement chimique inhabituel du proton 10 a été observé en comparaison des précédents spectres de **L1** et de ses intermédiaires ($\delta \approx 3,35$ ppm). De plus, dans le cas d'une conformation chaise-chaise un couplage NOESY est observé entre le proton 9 et les protons axiaux 6/8. Ce couplage n'est pas présent ici, ce qui laisse penser que la bispidine a basculée en position chaise-bateau (Figure 2.11).

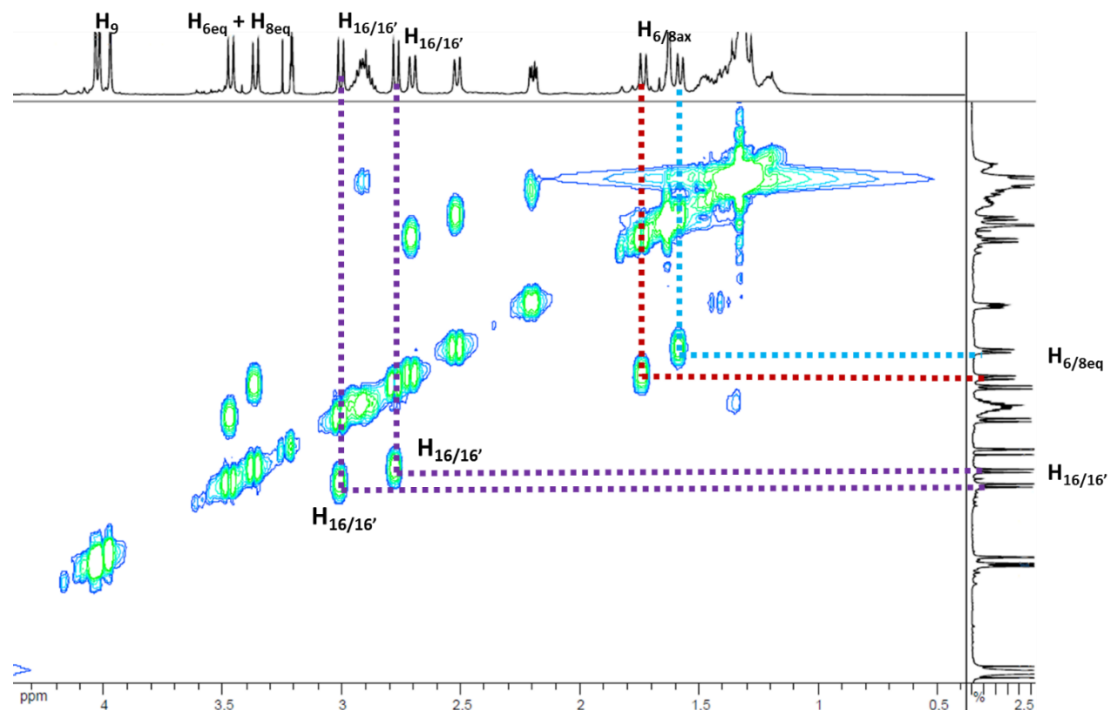


Figure 2.11 : Spectre RMN ^1H NOESY du bispidol **9** (500 MHz, MeOD, 25 °C).

Cependant, après déprotection, le déplacement chimique du proton 10 est de nouveau dans la région attendue (Figure 2.12) et le couplage entre les protons 9 et 6/8ax est de nouveau visible sur le spectre NOESY du ligand **L2** signifiant le retour à une conformation chaise-chaise (Figure 2.13). Un exemple de ce type de changement de conformation en solution a déjà été décrit et l'étude montrait qu'en faisant varier le pH il était possible de passer de la conformation chaise-chaise à chaise-bateau et même à bateau-bateau.⁵

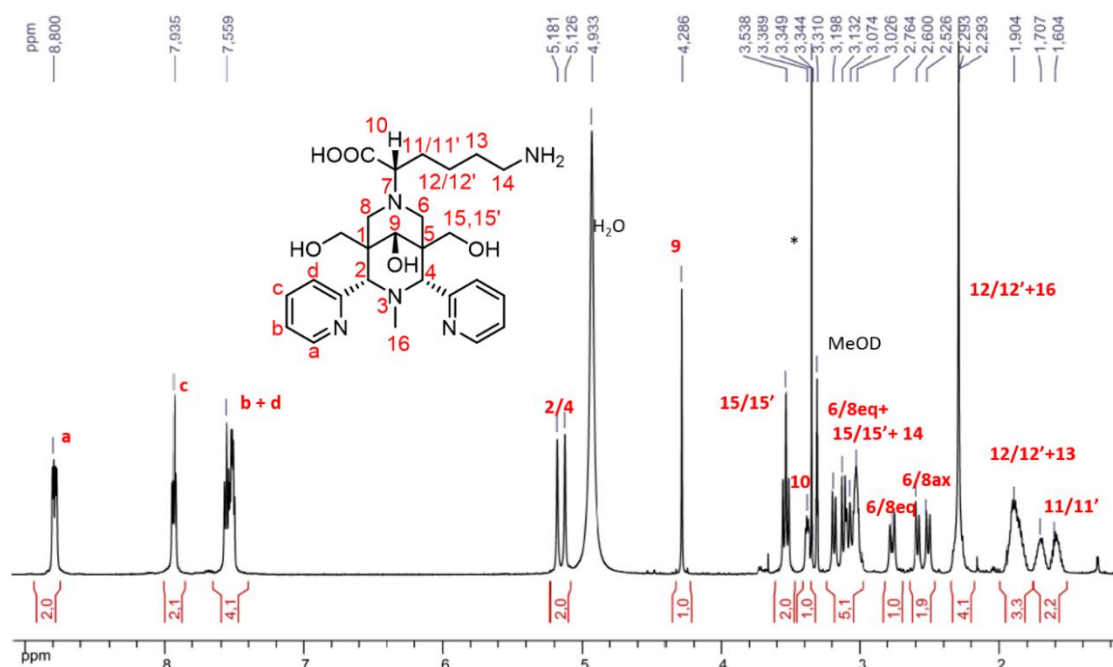


Figure 2.12 : Spectre RMN 1H du ligand L_2 (500 MHz, MeOD, 25 °C).

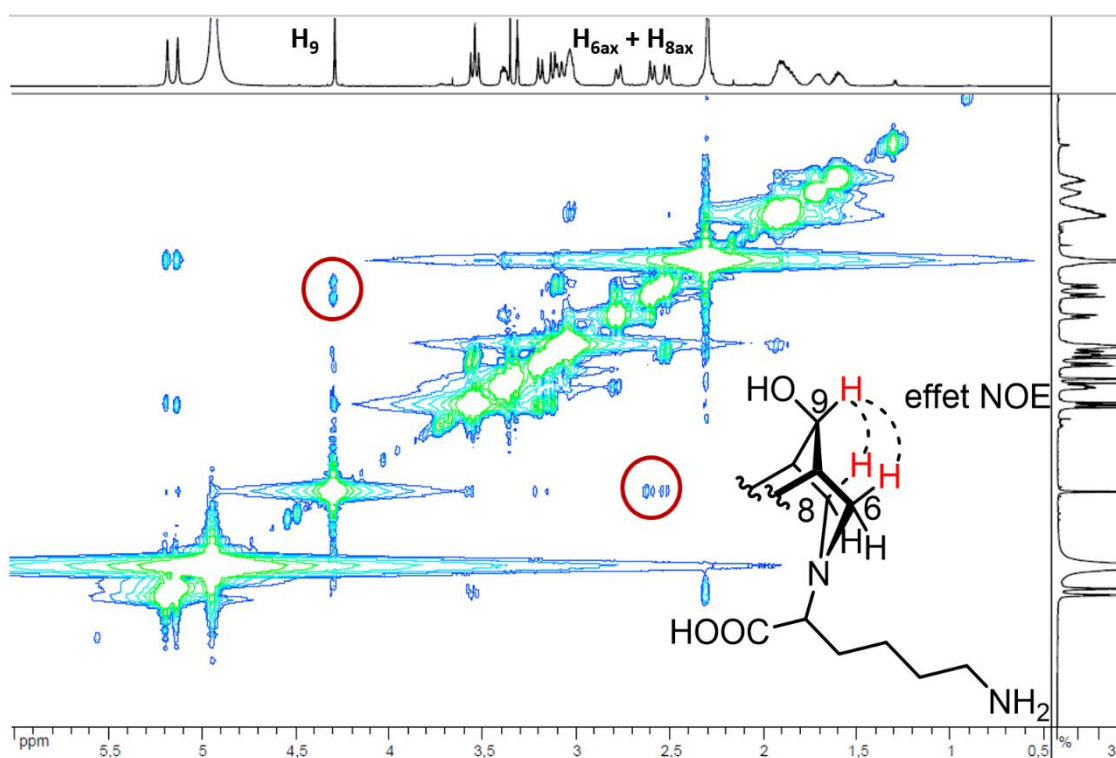
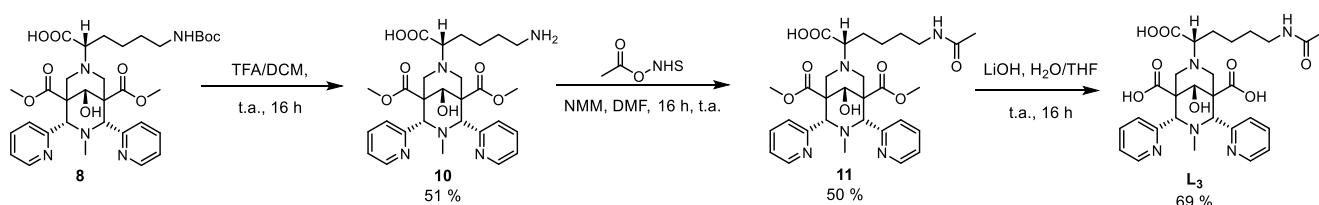
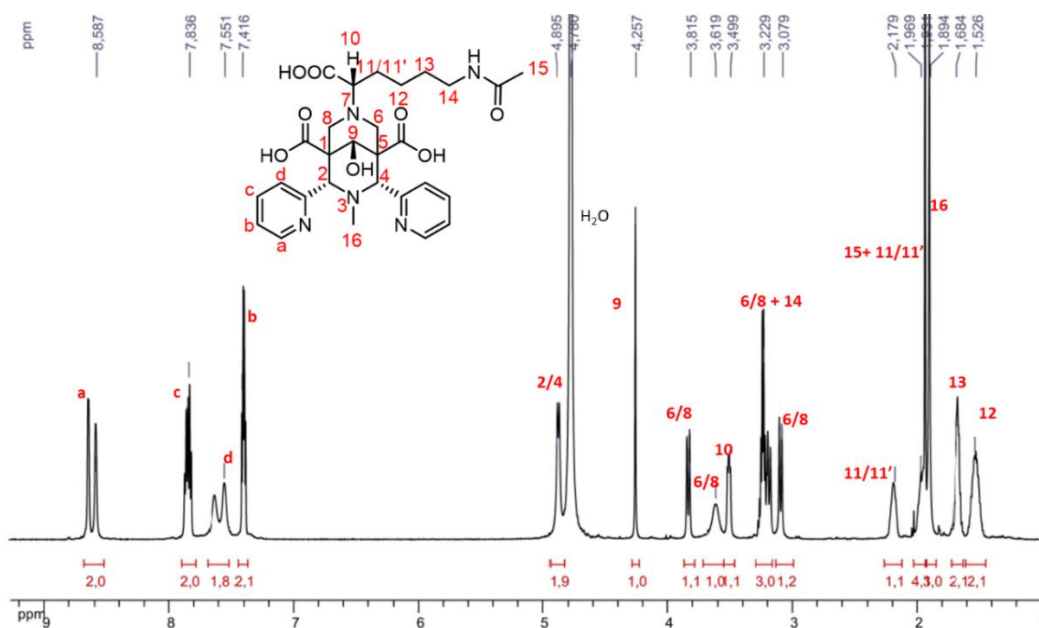


Figure 2.13 : Spectre RMN NOESY du ligand L_2 (500 MHz, MeOD, 25 °C).

2.3. Synthèse du ligand **L3**.

La synthèse du ligand **L3** a été réalisée en adaptant le protocole décrit par Roux et al.⁴ La première étape de la synthèse du ligand **L3** est le retrait du groupement Boc avec un mélange TFA/DCM pour accéder au composé **10** avec un rendement de 51 %. L'amine primaire de la lysine de **10** subit ensuite un couplage peptidique avec l'acétate de N-succinimidyl en présence de N-méthylmorpholine dans la DMF. Le composé **11** est ainsi obtenu avec un rendement de 50 %. Le ligand **L3** (110 mg sous la forme $C_{28}H_{35}N_5O_8 \cdot 0,5.LiCl$) est finalement obtenu après l'hydrolyse des esters méthyliques avec un rendement de 69 % (Figure 2.14). Le spectre RMN montre la présence du méthyle de l'acétamide à 1,96 ppm confirmant ainsi que le couplage a bien été réalisé (Figure 2.15).

Figure 2.14 : Synthèse du ligand **L3**.Figure 2.15 : Spectre RMN ¹H du ligand **L3** (600 MHz, D₂O, pD = 6,5, 25 °C).

2.4. Synthèse du ligand **L4**.

Le ligand **L4** a été synthétisé en utilisant le protocole développé pour **L1**. Ainsi, le composé **12** a été obtenu à partir d'une double réaction de Mannich entre le précurseur **P1**, le l'acide L-glutamique et le formaldéhyde. La seconde étape est la réduction de la cétone centrale, comme précédemment, qui permet d'accéder au composé **13**. Enfin, le ligand **L4** (100 mg sous la forme $C_{25}H_{28}N_4O_9 \cdot 2(H_2O)$) a été obtenu après hydrolyse des groupements méthylesters avec un rendement de 20 % sur les deux étapes (Figure 2.16).

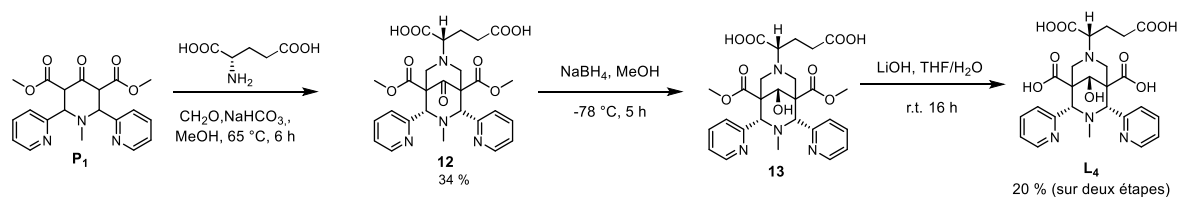


Figure 2.16 : Synthèse du ligand **L4**.

La principale difficulté de cette réaction se situe dans la purification de la première étape. En effet, le composé **12** a précipité difficilement et une minorité a pu être isolée par précipitation dans l'acétonitrile (34 %). Cette étape nécessite donc une optimisation. Une possibilité serait d'utiliser une fonction glutamate dont l'acide terminal serait protégé par un groupement ester afin de diminuer la polarité de la bispidone formée et de faciliter la précipitation dans des solvants polaires comme le méthanol ou l'acétonitrile. Le spectre RMN proton présente les signaux classiques de la bispidol. Comme pour le ligand **L1**, les protons 11/11' en alpha du centre asymétrique ne sont pas équivalents et sont facilement identifiables sur le spectre (Figure 2.17).

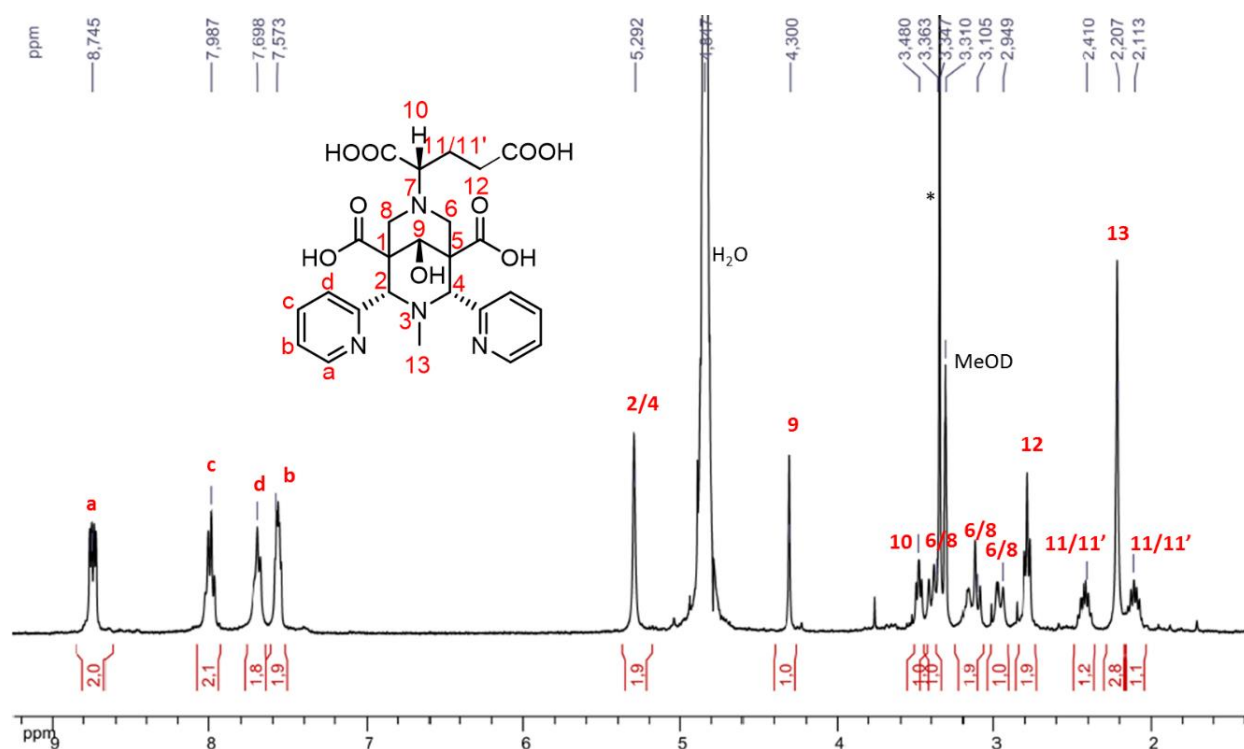


Figure 2.17 : Spectre RMN ^1H du ligand L_4 (400 MHz, MeOD, 25 °C), *MeOH.

3. Synthèse des bispidines avec un bras dérivé du méthylèncarboxylate

3.1. Synthèse des ligands L_5 et L_6 .

Les ligands L_5 et L_6 ont été synthétisés en utilisant l'intermédiaire **5** afin d'ajouter, en position N7, un bras méthylèncarboxylate ou son analogue, acide 2,2-diméthyléthanoïque contenant deux méthyles à la place des protons du CH_2 (Figure 2.18). Pour ce faire, le composé **5** a réagi avec le bromoacétate d'éthyle ou avec le 2-bromo-2-méthylpropionate de méthyle dans une réaction de substitution nucléophile, en présence de bicarbonate de potassium dans l'acétonitrile à 70 °C, ce qui permet d'accéder aux bispidols **14** et **15** respectivement. Lors de précédente réaction de substitution nucléophile, une quantité importante de produit a été perdue lors de l'étape de purification par FPLC (SiO_2 , DCM/MeOH). Il semble qu'à la fin de cette réaction, le produit obtenu était majoritairement sous la forme d'un complexe de potassium et que ce dernier est resté accroché sur la colonne de silice. C'est pourquoi, les composés **14** et **15** (ainsi que les suivants) ont été directement hydrolysés après cette étape en présence d'hydroxyde de lithium dans un mélange THF/eau. Les ligands L_5 (124 mg sous la forme $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_7 \cdot \text{HCl}$) et L_6 (125 mg sous la forme $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_7 \cdot 2\text{HCl} \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$) ont alors été obtenus avec un rendement de 51 % et 31 % respectivement. A titre de comparaison, le ligand L_5 avait préalablement été

synthétisé au laboratoire⁶ par deux réactions de Mannich à partir de la glycine avec un rendement global inférieur à 20 % sur les trois étapes. La synthèse mettant en jeu l'intermédiaire **5** est donc équivalente en terme de rendement mais possède l'avantage d'une plus grande versatilité. De plus, des travaux récents (résultats non publiés, thèse de A. Mahamoud en cours) ont permis de plus que doubler les rendements de la synthèse de l'intermédiaire **5**. Le rendement du ligand **L6** est inférieur à celui de **L5** car après purification sur FPLC (C₁₈, MeOH/H₂O) une fraction contenant le composé **5** totalement hydrolysé a été isolée, ce qui signifie que la réaction n'était pas complètement finie. L'encombrement stérique causé par les fonctions méthyles a probablement entraîné une diminution de la réactivité. Plusieurs pistes pourraient être étudiées afin d'améliorer le rendement de la substitution nucléophile, comme la durée de la réaction, la température, le solvant, le choix de la base (organique/inorganique), l'ajout de KI ou la quantité de 2-bromo-2-méthylpropionate de méthyle.

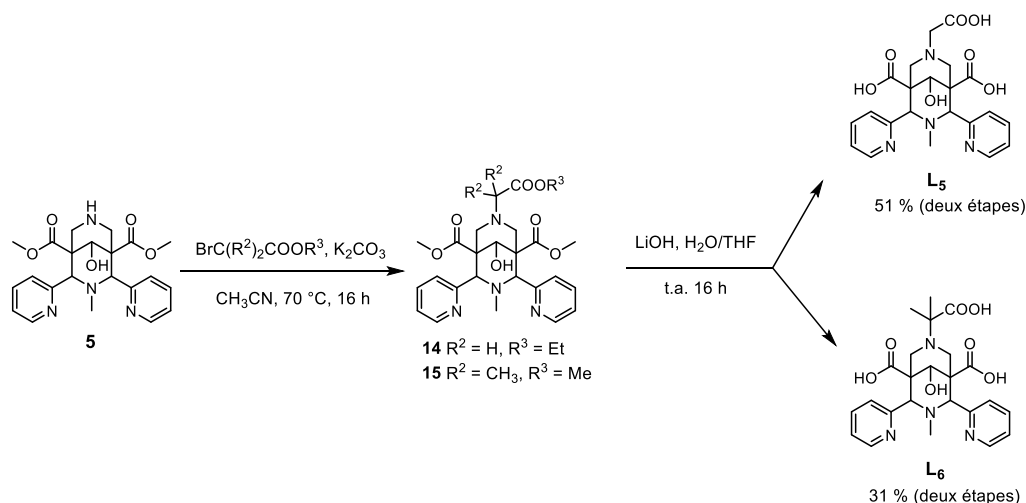


Figure 2.18 : Synthèse des ligands **L5** et **L6**.

Le spectre RMN du ligand **L₅** présente un singulet à 2,82 ppm qui intègre pour 2 protons et permet de confirmer que la réaction un bien eu lieu (Figure 2.19).

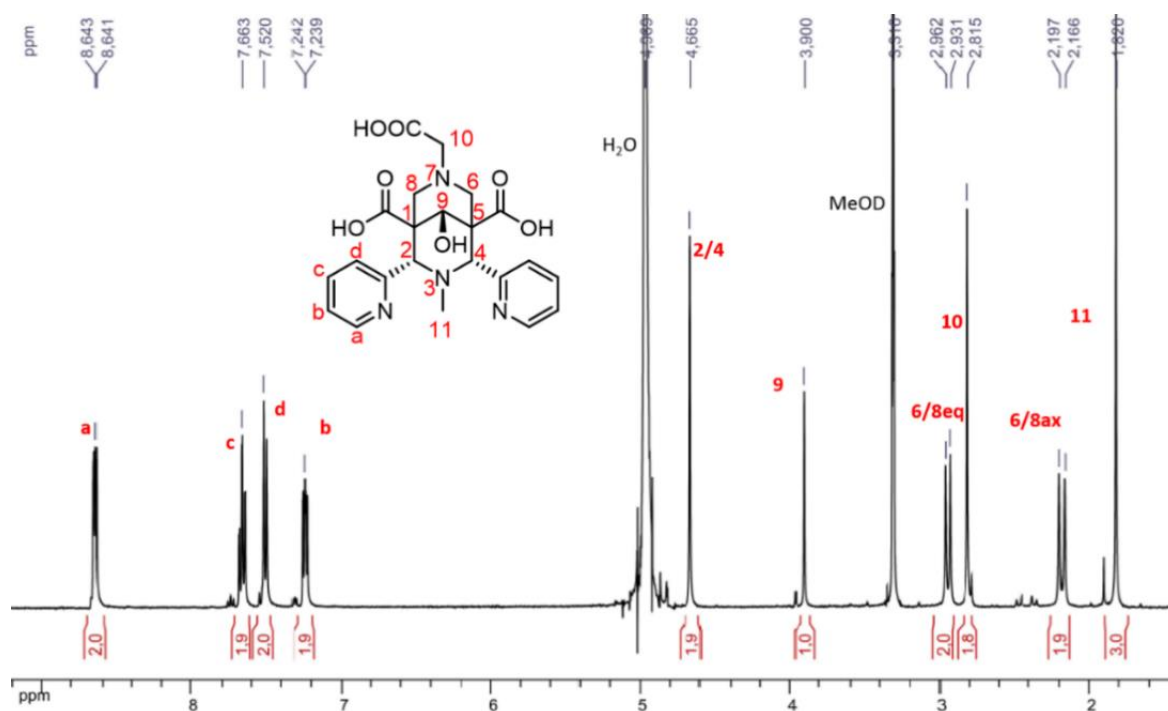


Figure 2.19 : Spectre RMN ¹H du ligand **L₅** (400 MHz, MeOD, 25 °C).

Pour le ligand **L₆**, un spectre avec des signaux larges a été obtenu (Figure 2.20). Il est possible que la présence des groupements méthyles limite la rotation du bras entraînant la présence de plusieurs rotamères en solution induisant ainsi des signaux larges. Un moyen qui permet d'obtenir des pics plus fins est d'ajouter du zinc(II) afin de rigidifier la structure de la molécule. Après ajout du zinc(II), les pics étaient en effet beaucoup plus fins. L'ajout de la fonction a finalement été confirmé par la présence d'un singulet à 1,31 ppm qui intègre pour 6 et qui correspond aux méthyles 10.

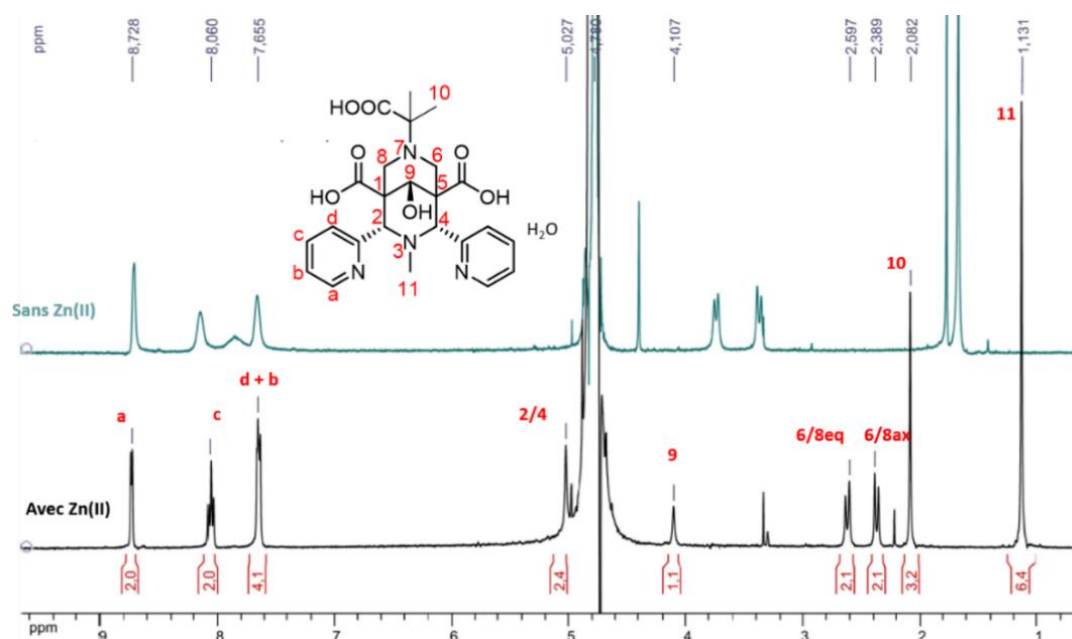
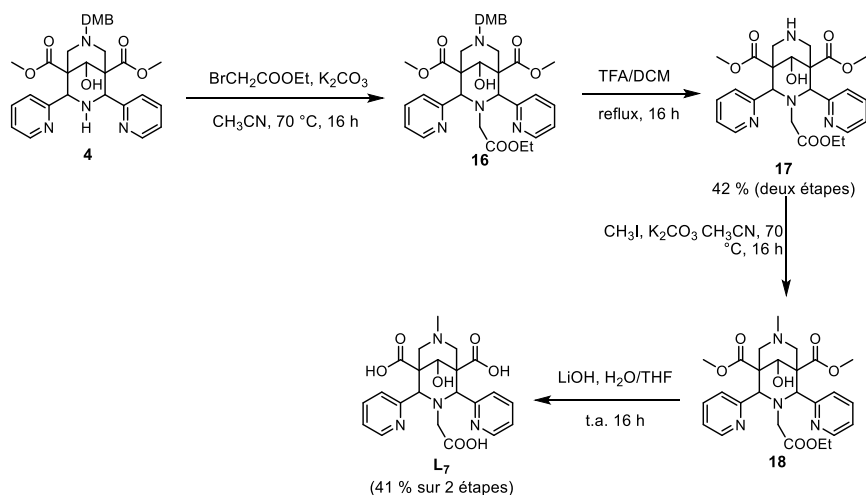


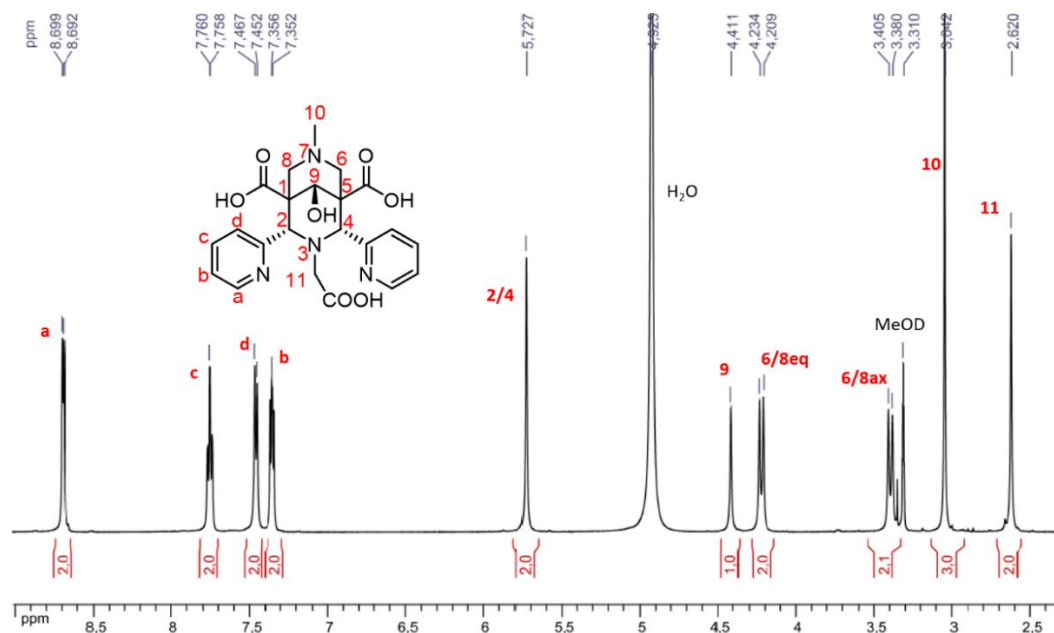
Figure 2.20 : Spectre RMN ^1H du ligand L_6 sans (courbe noir) et avec (courbe bleu) ZnCl_2 (400 MHz, D_2O , 25°C).

3.2. Synthèse du ligand L_7 .

Le ligand L_7 a été obtenu en adaptant le protocole décrit par Comba et al.² (Figure 2.21). Premièrement, le composé **4** a subi une réaction de substitution nucléophile avec le bromoacétate d'éthyle pour accéder au composé **16**. Le spectre RMN brut du composé **16** montrait deux espèces qui ont été attribuées au produit attendu et sa forme complexée avec du potassium. Le groupement diméthoxybenzyle du composé **16** a ensuite été retiré en présence de TFA afin d'obtenir **17** avec 42 % de rendement sur les deux étapes. L'étape suivante était l'ajout d'une fonction méthyle par substitution nucléophile avec l'iodométhane et finalement les esters méthyliques et l'ester éthylique de **18** ont été hydrolysés pour donner le ligand L_7 (160 mg sous la forme $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_{7.2,5}(\text{H}_2\text{O})$) avec 41 % de rendement sur les deux dernières étapes.

Figure 2.21 : Synthèse du ligand L₇.

Sur le spectre RMN, deux singulets intégrant pour 2 protons à 2,62 ppm et pour 3 protons à 3,04 ppm permettent de confirmer la présence des fonctions méthylèncarboxylate et méthyle respectivement sur le ligand L₇ (Figure 2.22). De plus, sur le spectre 2D NOESY un couplage entre les protons 11 et 2/4 et un autre couplage entre les protons 6/8 équatoriaux et 10 sont observés et permettent de confirmer que le bras méthylèncarboxylate a bien été ajouté en position N3 et la fonction méthyle en position N7 (Figure 2.23). Un couplage entre le proton 9 et les protons 6/8 axiaux confirme que la fonction OH pointe vers l'azote en position N3.

Figure 2.22 : Spectre RMN ¹H du ligand L₇ (400 MHz, MeOD, 25 °C).

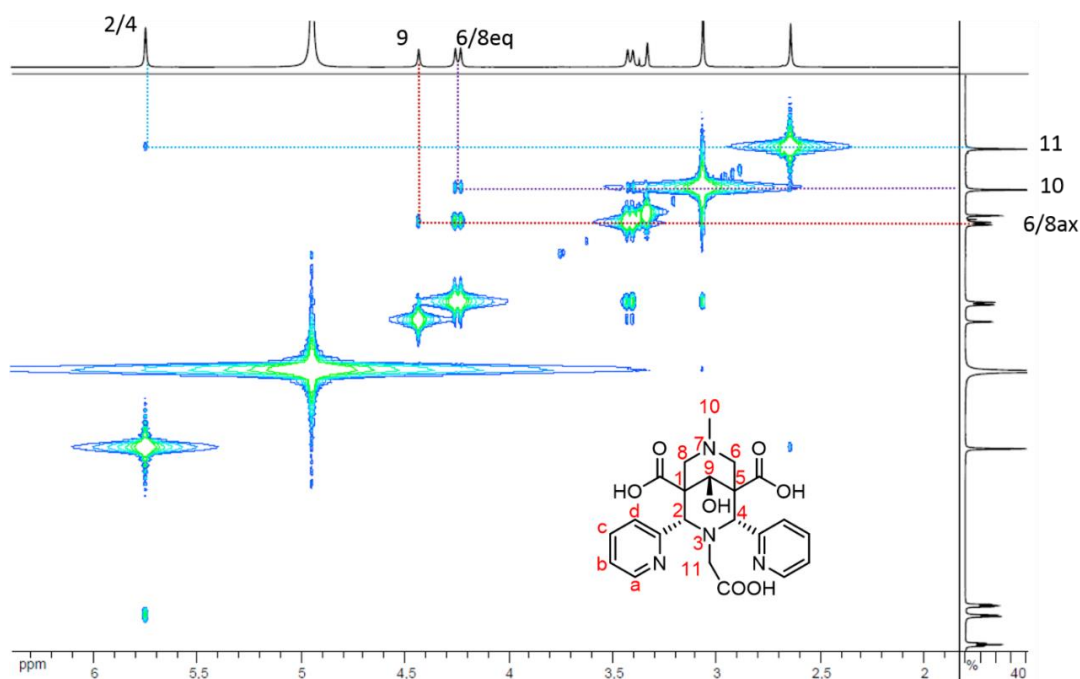


Figure 2.23 : Spectre RMN ^1H NOESY du ligand L_7 (500 MHz, MeOD, 25 °C).

3.3. Synthèse du ligand L_8 .

Le dernier ligand de cette famille est un ligand hexadentate. Il contient deux bras méthylèncarboxylates sur les positions N3 et N7. Il a été obtenu en faisant réagir l'intermédiaire **6** avec le bromoacétate d'éthyle dans une double réaction de substitution nucléophile. Après alkylation, une hydrolyse des esters méthyliques et éthyliques est directement réalisée. Le ligand L_8 est finalement obtenu sous forme $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_9 \cdot 2(\text{LiOH}) \cdot \text{H}_2\text{O}$ (150 mg) avec un rendement de 41 % sur deux étapes (Figure 2.24).

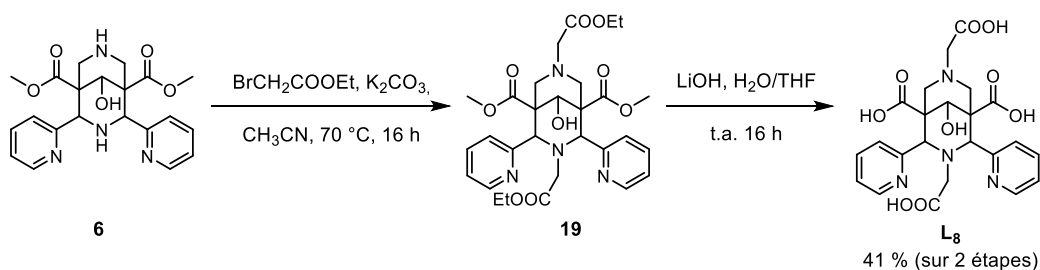


Figure 2.24 : Synthèse du ligand L_8 .

La présence de deux singulets intégrant pour deux protons à 2,82 ppm et 3,74 ppm sur le spectre RMN ^1H permet de confirmer que la double alkylation a bien eu lieu (Figure 2.25).

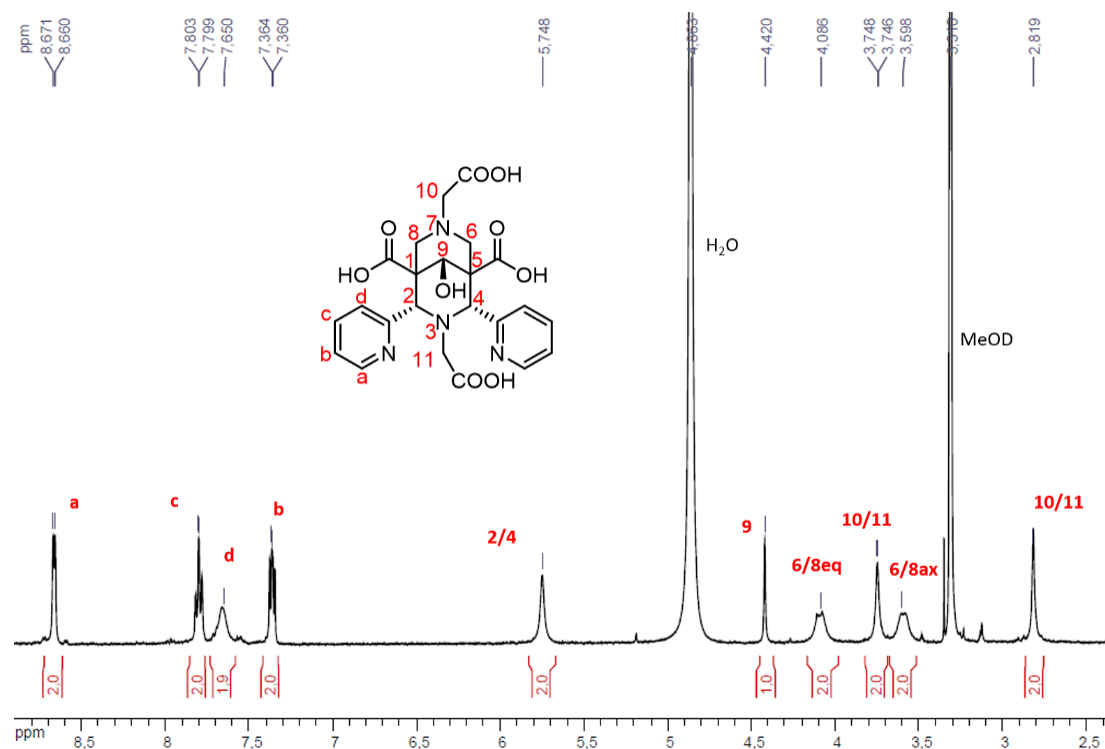
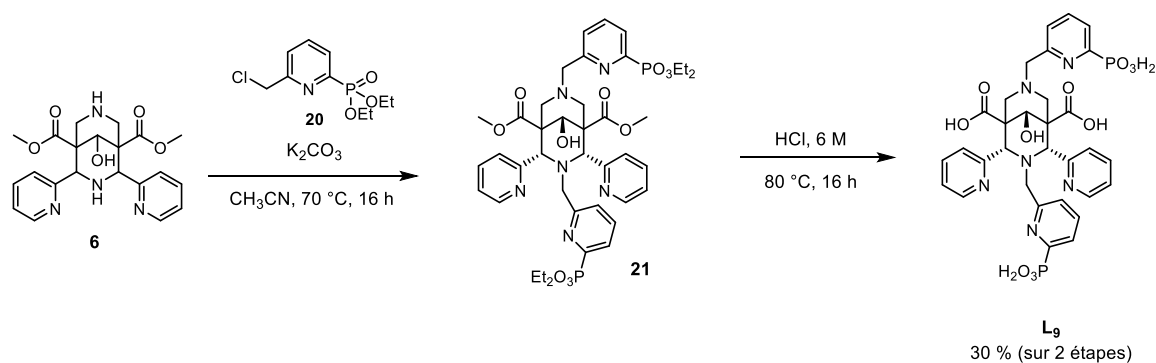


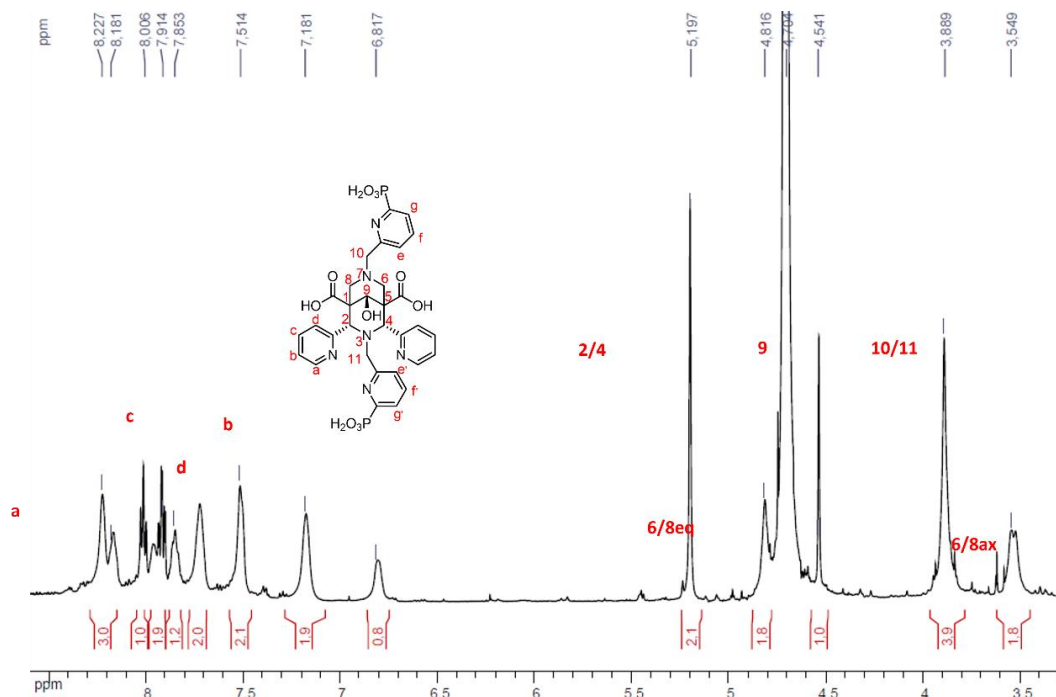
Figure 2.25 : Spectre RMN ^1H du ligand L_8 (400 MHz, MeOD, 25 °C).

4. Synthèse de la bispidine phosphonatée L_9 .

Grâce à l'obtention des intermédiaires **5** et **6**, il est possible d'envisager l'ajout de différents types de groupements par des réactions d'alkylation classique. Ainsi, pour la première fois une bispidine contenant des groupements pyridinyl-phosphonates a été synthétisée. Elle a donc été obtenue après une double réaction de substitution nucléophile entre les composés **6** et **20**⁷. Les groupements éthyles ont ensuite été hydrolysés dans une solution de HCl à 6M à 80 °C. Le ligand L_9 a ainsi été obtenu sous la forme $\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_9\text{P}_2 \cdot 3(\text{HCl}) \cdot 2.5(\text{H}_2\text{O})$ (96 mg), avec un rendement de 30 % sur les deux étapes (Figure 2.26). Ici encore, l'intermédiaire **21** n'a pas encore été isolé et il a été préféré de purifier directement le ligand L_9 sous sa forme finale par colonne chromatographique sur phase inverse (C18, gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$).

Figure 2.26 : Synthèse du ligand L₉.

Du fait de la présence des groupements pyridinyl-phosphonates de nombreux signaux sont présents dans les déplacements chimiques des aromatiques. L'attribution des pics des aromatiques s'est fait par comparaison des déplacements chimiques des précédentes bispidines, néanmoins un spectre 2D devra être réalisé afin de confirmer cette attribution. Un singulet intégrant pour 4 protons à 3,89 ppm est observé. Il correspond aux deux CH₂ des bras coordinants (Figure 2.27). Le spectre RMN du phosphore montre la présence d'un seul pic et confirme la présence d'une seule espèce (Figure 2.28). De plus, le composé a été analysé par ES-MS et analyse élémentaire.

Figure 2.27 : Spectre RMN ¹H du ligand L₉ (400 MHz, D₂O, 25 °C).

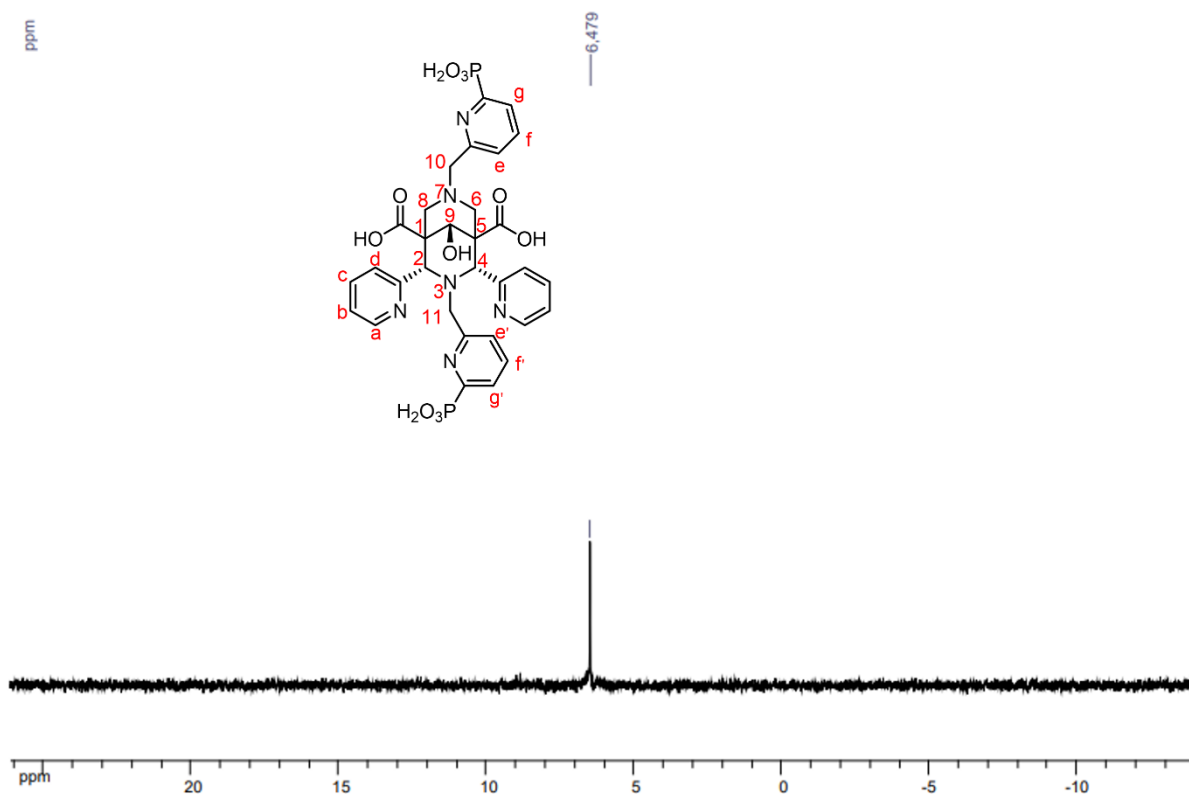


Figure 2.28 : Spectre RMN ^{31}P du ligand **L9** (162 MHz, D_2O , 25 °C).

5. Conclusion

En conclusion de ce chapitre, huit nouvelles bispidines ont été synthétisées. Pour cela, deux voies de synthèse ont été utilisées afin de permettre l'insertion de différents types de fonctions coordinantes. La première, utilisée pour le substituant *L*-lysine et ses dérivés met en œuvre une double réaction de Mannich à partir des résidus acides aminés. La deuxième fait intervenir des intermédiaires clefs (les composés **5** et **6**) dont les fonctions amines secondaires peuvent être substituées par les groupements d'intérêt au moyen de réactions de substitution nucléophiles. Ainsi, six bispidines pentadentates, une bispidine hexadentate et une bispidine octadentate ont été obtenues. Tous ces ligands (sauf le ligand **L9**), ont ensuite été complexé au manganèse(II) afin d'étudier la stabilité thermodynamique, la relaxivité et l'inertie cinétique de ces nouveaux complexes. L'ensemble des résultats obtenus seront présentés dans le chapitre suivant.

6. Références

- (1) Kolanowski, J. L.; Jeanneau, E.; Steinhoff, R.; Hasserodt, J. Bispidine Platform Grants Full Control over Magnetic State of Ferrous Chelates in Water. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19* (27), 8839–8849. <https://doi.org/10.1002/chem.201300604>.
- (2) Comba, P.; Jermilova, U.; Orvig, C.; Patrick, B. O.; Ramogida, C. F.; Rück, K.; Schneider, C.; Starke, M. Octadentate Picolinic Acid-Based Bispidine Ligand for Radiometal Ions. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23* (63), 15945–15956. <https://doi.org/10.1002/chem.201702284>.
- (3) Legdali, T.; Roux, A.; Platas-Iglesias, C.; Camerel, F.; Nonat, A. M.; Charbonnière, L. J. Substitution-Assisted Stereochemical Control of Bispidone-Based Ligands. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (24), 11167–11176. <https://doi.org/10.1021/jo302248c>.
- (4) Roux, A.; Gillet, R.; Huclier-Markai, S.; Ehret-Sabatier, L.; Charbonnière, L. J.; Nonat, A. M. Bifunctional Bispidine Derivatives for Copper-64 Labelling and Positron Emission Tomography. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15* (6), 1475–1483. <https://doi.org/10.1039/C6OB02712A>.
- (5) Norrehed, S.; Erdélyi, M.; Light, M. E.; Gogoll, A. Protonation-Triggered Conformational Modulation of an N,N'-Dialkylbispidine: First Observation of the Elusive Boat–Boat Conformer. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11* (37), 6292. <https://doi.org/10.1039/c3ob41122b>.
- (6) Roux, A. Synthèse et Fonctionnalisation de Bispidines pour la Complexation du ^{64}Cu en vue d'applications en Imagerie Médicale Par Tomographie à Émission de Positrons et en Radiothérapie, Thèse de l'Université de Strasbourg, **2014**.
- (7) Salaam, J.; Tabti, L.; Bahamyirou, S.; Lecointre, A.; Hernandez Alba, O.; Jeannin, O.; Camerel, F.; Cianférani, S.; Bentouhami, E.; Nonat, A. M.; Charbonnière, L. J. Formation of Mono- and Polynuclear Luminescent Lanthanide Complexes Based on the Coordination of Preorganized Phosphonated Pyridines. *Inorg. Chem.* **2018**, *57* (10), 6095–6106. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b00666>.

CHAPITRE III

Etudes Physico-Chimiques

L'ensemble de ces études de caractérisation a été réalisé au Centre de Biophysique Moléculaire dans l'équipe du Dr Eva Jakab Toth et en partie par Daouda Ndiaye.

1. Etude de la stabilité thermodynamique.

1.1. Généralités.

1.1.1. Objectif

Le but de cette étude est de déterminer la protonation des ligands et la stabilité thermodynamique de leurs complexes de zinc(II) et de manganèse(II). Le choix du zinc(II) comme métal de comparaison repose sur la similarité chimique de ce dernier avec le manganèse(II) et sur son abondance dans les systèmes biologiques. Le zinc(II) se présente donc comme le compétiteur le plus important pour le manganèse(II). Les résultats de ces travaux seront présentés en trois parties. La première partie abordera l'étude des bispidines **L₁** et **L₄** qui contiennent une fonction acide aminé. Leur comparaison permettra d'observer l'influence de la présence d'une amine primaire, chargée positivement à pH physiologique, et d'une fonction carboxylate, chargée négativement au pH neutre, sur la stabilité thermodynamique. La deuxième partie portera sur l'étude des bispidines substituées par une fonction de type méthylencarboxylate. Elle permettra d'observer l'influence de la position, du nombre de bras coordinants et de l'ajout de groupements méthyles (**L₆**). La dernière partie concernera l'étude de la bispidine **L₁₀** portant une fonction phosphonate. Elle permettra de comparer la stabilité du complexe de manganèse entre une bispidine phosphonatée et une bispidine carboxylatée (Figure 3.1).

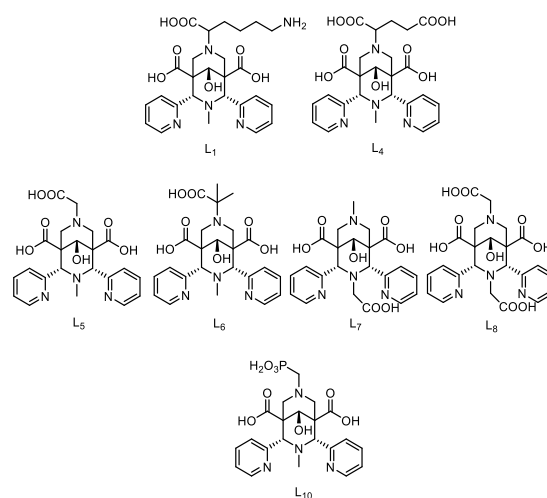


Figure 3.1 : Ligands discutés dans cette partie.

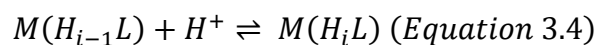
1.1.2. Définition de la stabilité thermodynamique d'un complexe.

Afin de prédire la stabilité *in vivo* d'un nouveau complexe, on s'appuie sur des propriétés physiques comme la stabilité thermodynamique et l'inertie cinétique face à la dissociation. Ainsi, la constante de stabilité thermodynamique K_{ML} d'un complexe quantifie l'affinité du métal pour un ligand donné et permet de savoir la quantité de métal libre dans l'environnement lorsque le système a atteint l'équilibre (Equation 3.1). la constante de stabilité thermodynamique K_{ML} est définie par l'équation 3.2 : ¹



Où [ML], [M] et [L] représentent les concentrations d'équilibre du complexe, du métal et du ligand, sous sa forme déprotonée.

Du fait du caractère multidenté des ligands, certains groupements donneurs peuvent être protonés à bas pH et ces complexes protonés sont alors notés $M(H_iL)$ (Equation 3.4). Les constantes de protonation de ces complexes sont définies par l'équation 3.5 :



$$K_{M(H_iL)} = \frac{[M(H_iL)]}{[M(H_{i-1}L)][H^+]} \text{ (Equation 3.5)}$$

où $i = 1, 2, \dots, n$ et $[H^+]$, $[M(H_{i-1}L)]$ et $[M(H_iL)]$ sont les concentrations d'équilibre des protons et des espèces $M(H_{i-1}L)$ et $M(H_iL)$.

Afin de comparer différents systèmes, les auteurs sont souvent amenés à utiliser le pM ($-\log[M]_{\text{libre}}$). Ce paramètre s'apparente à une constante de stabilité conditionnelle qui permet de quantifier la quantité de métal libre à pH physiologique (7,4) et dans des conditions expérimentales définies. Par soucis de comparaison avec les données de la littérature, nous avons choisi dans cette étude de calculer le pM pour des concentrations totales de ligand et de métal $c_L = c_M = 10^{-5}$ M.

Dans notre cas, l'étude a été réalisée par titrage potentiométrique avec une concentration équimolaire en ligand et en métal. Pour les complexes de Mn^{2+} (sauf MnL_7 et MnL_8), la complexation était trop lente pour être étudiée par titrage direct. Les titrages ont donc été

réalisés en préparant des échantillons individuels (titrage dit par « batch ») contenant chacun un volume différent de base. Une fois les mesures réalisées, le traitement des données se fait par le logiciel Hyperquad, qui va calculer les constantes de protonation et les constantes de stabilité. Les résultats de ces études potentiométriques seront présentés dans cette première partie.

1.2. Etude des bispidines avec un bras dérivé des acides aminés.

Les ligands **L1** et **L4** présentent huit sites de protonation. Généralement, les protons des amines pyridiniques ont des $\log K_H$ trop bas pour être observés par titrage potentiométrique car la fenêtre d'étude se situe entre pH 2 et pH 12. Pour les deux ligands, cinq constantes de protonation ont été obtenues (Figure 3.3 a). Les premières valeurs de $\log K_H$ de **L1** et **L4** sont de 11,44(1) et 9,52(4) respectivement. Elles peuvent être attribuées à la protonation d'une des amines tertiaires du squelette. Une précédente étude du ligand **L10** avait conclu que les deux amines tertiaires n'étaient pas protonées simultanément.² Le deuxième $\log K_H$ est de 10,31(2) pour **L1** et 5,06(7) pour **L2**. Il correspond respectivement à la protonation de l'amine primaire de la lysine pour **L1** et à celle d'une des fonctions carboxylates pour le ligand **L4**. Les deux derniers $\log K_H$ de **L1** et **L4** correspondent aussi aux protonations des acides carboxyliques présents sur les deux ligands (Figure 3.2).

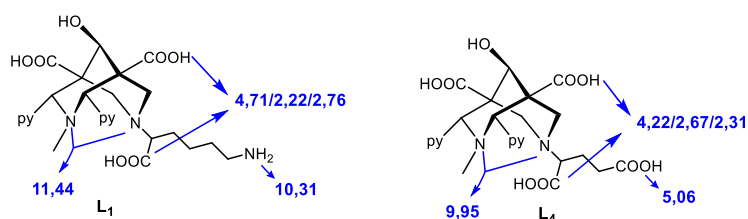


Figure 3.2 : Constantes de protonation des ligands **L1** et **L4**.

Les valeurs des constantes de stabilité des complexes de zinc(II) et des pZn des deux ligands ($\log K_{ZnL1} = 15,59(3)$; $pZn(L1) = 8,40$ et $\log K_{ZnL4} = 14,22(6)$; $pZn(L4) = 8,55$) sont supérieures à celles des complexes de manganèse ($\log K_{MnL1} = 12,21(5)$; $pMn(L1) = 6,65$ et $\log K_{MnL4} = 12,8(1)$; $pMn(L4) = 7,83$). Cet ordre suit la série de Irving-Williams où Zn^{2+} est à la fin tandis que Mn^{2+} se situe au début. Les constantes de stabilité des deux complexes de Mn^{2+} sont assez similaires ce qui n'est pas étonnant car les fonctions qui les distinguent ne sont pas impliquées dans la coordination (Figure 3.3 a). Le pMn de $MnL4$ est un peu plus élevé que celui de $MnL1$. Cette différence pourrait être associée à la différence de charge entre les deux espèces

présentent à pH physiologique qui induirait une interaction électrostatique plus forte avec L_4 qu'avec L_1 . En effet, sur le diagramme de distribution des complexes du ligand L_1 , l'espèce prédominante à pH 7 est $MnLH$ (neutre) tandis que pour MnL_4 il s'agit de MnL^{2-} (Figure 3.3, d et e).

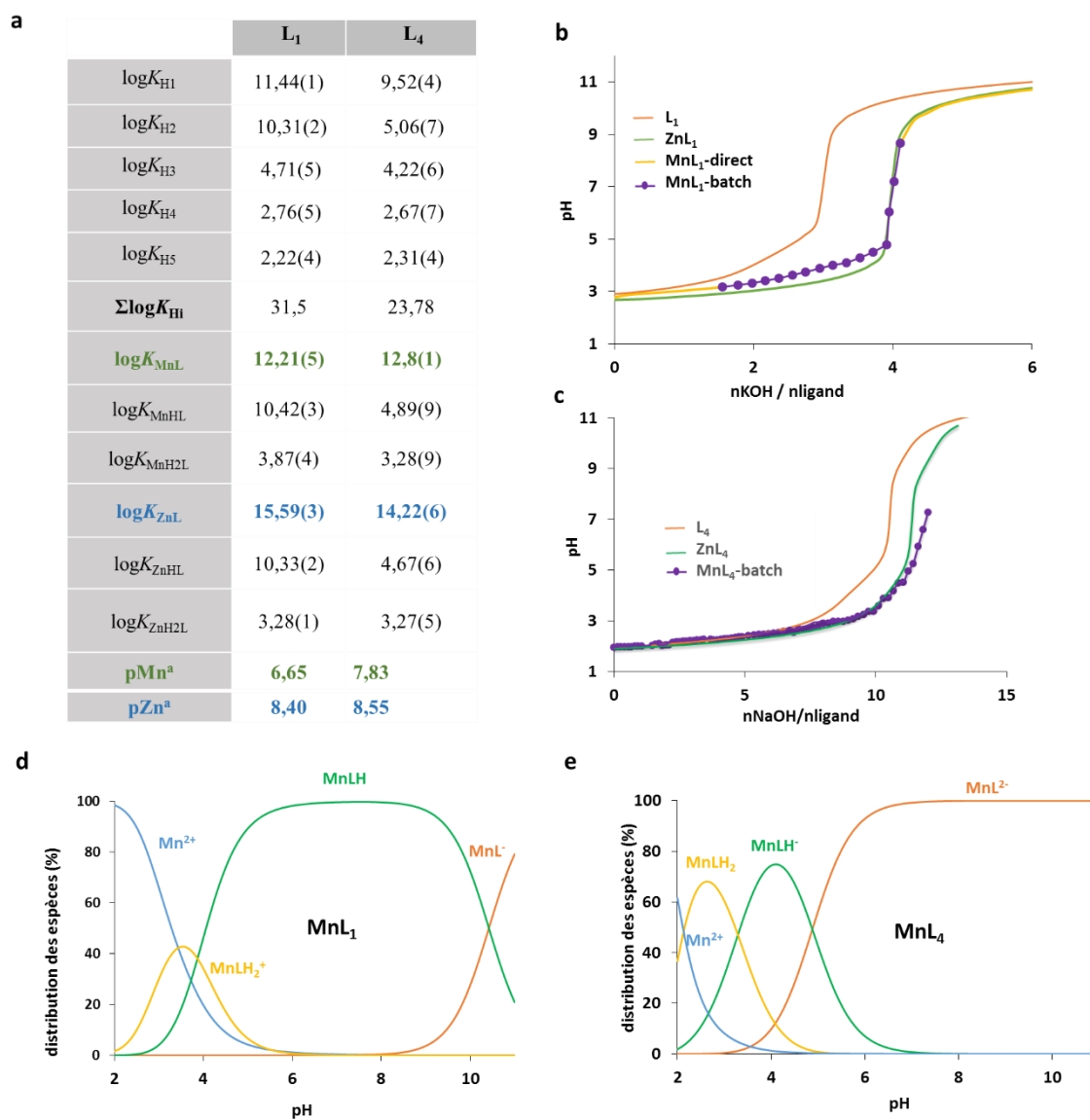


Figure 3.3 : a) Constantes de protonation des ligands L_1 et L_4 , constantes de stabilité des complexes de zinc(II) et manganèse(II) et valeur des pMn ($c_{Mn} = c_L = 10 \mu M$, pH 7,4). Les valeurs entre parenthèses sont les valeurs de déviation standard. Courbes de titrages potentiométriques en présence et en absence de métal b) de L_1 (25 °C, 0,1 M KCl, $c_L = c_M = 1,8 \text{ mM}$; 0,1 M KCl) et c) de L_4 (25 °C, 0,15 M NaCl, $c_L = c_M = 1,5 \text{ mM}$). Pour les systèmes $Mn:L$ les points correspondent à des titrages par « batch » et les courbes à des titrages directs. Diagrammes de distribution des systèmes d) MnL_1 ($c_L = c_M = 1 \text{ mM}$) et e) MnL_4 ($c_L = c_M = 1 \text{ mM}$).

1.3. Etude des bispidines avec un bras dérivé du méthylèncarboxylate.

Les ligands **L5**, **L6**, et **L7** possèdent sept sites de protonation et le ligand **L8** en possède huit. Les quatre ligands présentent au moins une constante de protonation qui est supérieure à 9 et qui correspond à la protonation des amines tertiaires du squelette (Figure 3.5., a, b et e). Les ligands **L5** et **L6** présentent un seul $\log K_H$ pour ces amines qui est de 9,54(4) et de 10,74(1) respectivement. Ainsi, comme pour les systèmes précédents, une seule des deux amines est protonée dans la gamme de pH qui est étudiée ($2 < \text{pH} < 12$).^{2,3} Cependant, dans les cas des ligands **L7** et **L8**, il est intéressant de noter que ces deux ligands présentant une fonction acide carboxylique en N3 possèdent une constante de protonation supplémentaire à des hauts pH. En effet, les deux premiers $\log K_H$ sont de 11,37(2) et 10,46(2) pour **L7** et de 9,91(1) et 9,05(1) pour **L8** (Figure 3.5, c, d et e). Ils correspondent à la protonation des deux amines tertiaires qui sont toutes les deux protonées simultanément, contrairement à celles des deux autres systèmes et à celles des ligands **L1** et **L4**. Du fait des répulsions électrostatiques que doivent engendrer ces deux amines protonés, la conformation chaise-chaise de ces deux ligands est peu probable. Des études en RMN 2D réalisées au Centre de Biophysique Moléculaire (Thèse de Daouda Ndiaye, Université d'Orléans 2021) ont montré que ces deux ligands étaient en fait sous une forme chaise-bateau.

Grâce à ces différents ligands, il est possible de différencier les acides carboxyliques présents sur N3, N7 et sur les côtés de la bispidine, c'est-à-dire ceux qui n'interviennent pas dans la coordination de l'ion métallique. D'abord, les quatre ligands présentent des $\log K_H$ quasiment similaires qui peuvent être associés à la protonation des fonctions carboxylates présentes sur les côtés. Ainsi, il s'agit de la deuxième et de la troisième constante de protonation pour **L5** ($\log K_{H2} = 5,11(6)$; $\log K_{H3} = 2,99(6)$) et **L6** ($\log K_{H2} = 5,55(1)$; $\log K_{H3} = 2,89(1)$) et de la troisième et de la cinquième constante de protonation pour **L7** ($\log K_{H3} = 4,6(3)$; $\log K_{H5} = 2,89(3)$) et **L8** ($\log K_{H3} = 5,66(2)$, $\log K_{H5} = 2,74(1)$). Ensuite, les ligands **L5**, **L6** et **L8** ont des $\log K_H$ proches qui sont de 1,80(5), 1,40(2) et 1,48(1) respectivement. Ils peuvent être associés à la protonation de la fonction carboxylate présente sur l'azote N7. Enfin, les ligands **L7** et **L8** possèdent un $\log K_H$ de 3,40(3) et 3,73(2) respectivement. Leurs similitudes permettent de conclure que ces derniers correspondent à la protonation de l'acide carboxylique présent en N3 respectivement (Figure 3.4).

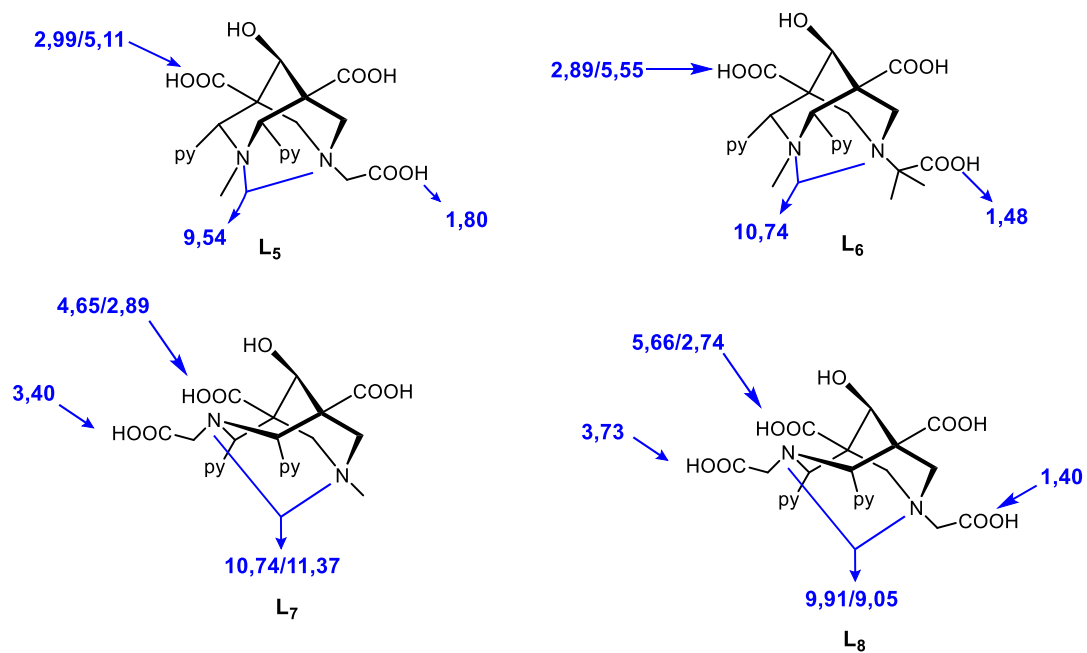


Figure 3.4 : Constantes de protonation des ligands L_5 , L_6 , L_7 et L_8 .

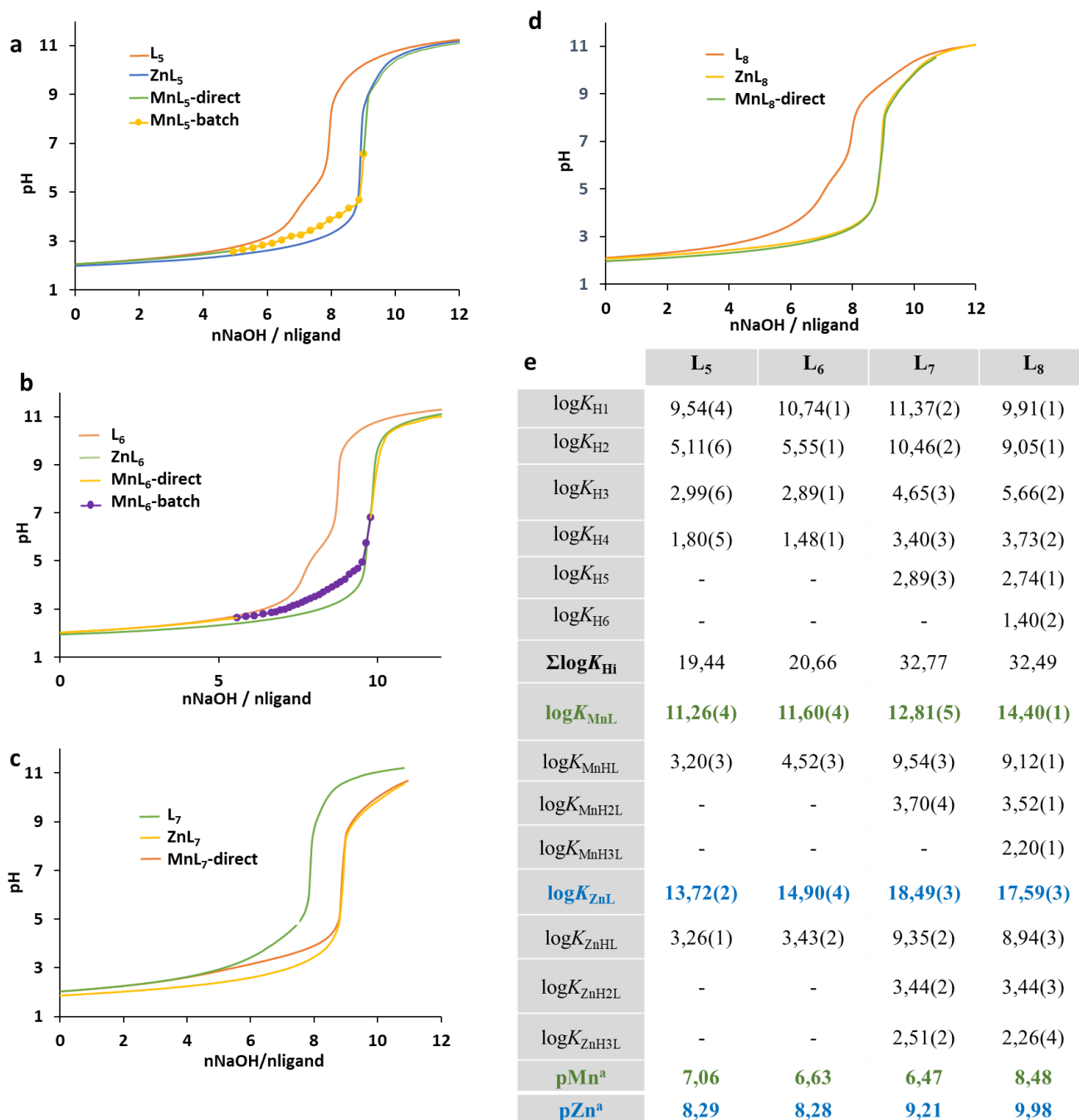


Figure 3.5 : a) Courbes de titrages potentiométriques en présence et en absence de métal a) de L₅, b) de L₆, c) de L₇ et d) de L₈. Conditions : 25 °C, 0,15 M NaCl, c_L = c_M = 1,6-1,8 mM. Pour les systèmes Mn :L les points correspondent à des titrages par « batch » et les courbes à des titrages directs. e) Constantes de protonation des ligands, constantes de stabilité des complexes de zinc(II) et manganèse(II) et valeurs des pMn (c_{Mn} = c_L = 10 μM, pH 7,4). Les valeurs entre parenthèses sont les valeurs de déviation standard.

Les études potentiométriques ont ensuite été menées en présence de zinc(II) et de manganèse(II) afin de déterminer les constantes de formation et de protonation des complexes. Pour les quatre ligands, les constantes de formation ($\log K_{ZnL}$ varie entre 13,72(2) et 18,49(3)) et les pZn (entre 8,28 et 9,98) des complexes de zinc(II) sont plus élevés que les constantes de formation des complexes de manganèse(II) ($\log K_{MnL}$ varie entre 11,26(4) et 14,40(1)) et que les pMn (entre 6,63 et 8,48). Cette tendance va donc dans le sens de la série d'Irving-Williams (Figure 3.5, e). Les complexes des ligands **L5** et **L6** présentent une seule constante de protonation ($\log K_{ZnHL5} = 3,26(1)$, $\log K_{MnHL5} = 3,20(3)$, $\log K_{ZnHL6} = 3,43(2)$, $\log K_{MnHL6} = 4,52(3)$), qui, comme pour les précédents systèmes, correspond à la protonation d'un des acides carboxyliques présent sur les côtés. Dans le cas des complexes avec les ligands **L7** et **L8** plusieurs constantes de protonation ont été obtenues. Les premiers $\log K_H$ des complexes sont de 9,54(4) et 9,35(2) pour **MnL7** et **ZnL7** respectivement et de 9,12(1) et 8,94(3) pour **MnL8** et **ZnL8** respectivement. Ces constantes de protonation peuvent être attribuées à la protonation d'une des amines tertiaires. Ici encore, les complexes de ces deux ligands se distinguent par la présence d'un $\log K_{MHL}$ pour ces amines qu'on ne retrouve pas dans les ligands **L5** et **L6** mais aussi dans les autres systèmes étudiés (Figure 3.5, e).^{2,3}

Les constantes de protonation restantes correspondent à la protonation des fonctions carboxylates coordinantes introduites en N3 et/ou N7 (Figure 3.5 e). Les complexes avec **L8** et le complexe de zinc(II) avec **L7** présentent une constante de protonation supplémentaire à des pH acides qui laisse supposer que la fonction carboxylate en N3 de **L7** et qu'une des fonctions carboxylates en N3 ou N7 de **L8** soit protonée. Ces deux $\log K_{MHL}$ pourraient aussi correspondre aux acides carboxyliques présents sur les côtés mais jusqu'à présent une seule constante de protonation de ces deux acides carboxyliques a toujours été mesurée.^{2,3} Les diagrammes de distribution montrent qu'à pH physiologique, l'espèce majoritaire des complexes **MnL5** et **MnL6** est **MnL** et que pour les complexes **MnL7** et **MnL8** l'espèce majoritaire est **MnLH** (Figure 3.6).

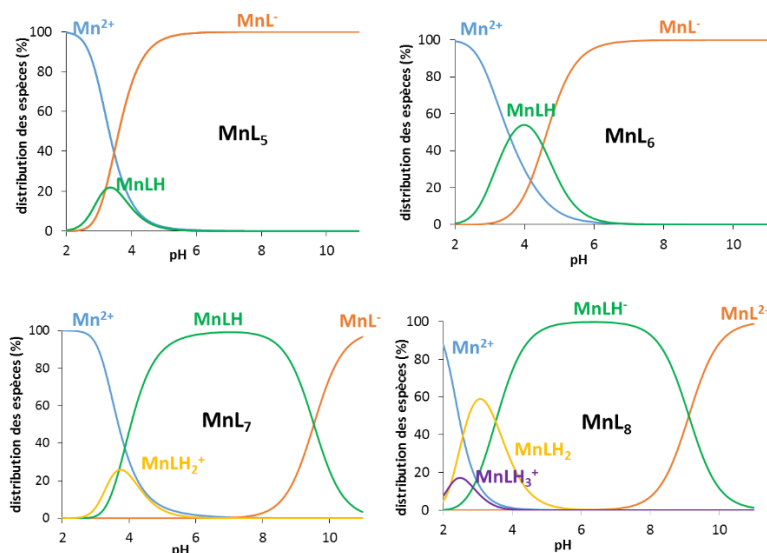


Figure 3.6 : Diagrammes de distribution des systèmes de MnL_5 , MnL_6 , MnL_7 et MnL_8 ($c_L = c_M = 1$ mM).

1.4. Etude de la bispidine phosphonaté L_{10} .

Le ligand L_{10} possède huit sites de protonation et quatre $\log K_H$ ont été obtenus. Ils sont en accord avec les $\log K_H$ qui ont été précédemment mesurés pour ce ligand.² La première constante de protonation ($\log K_{H1} = 11,15(1)$) correspond à la protonation d'une des amines tertiaires du squelette (Figure 3.8 a, b). La deuxième peut être attribuée à la première protonation de la fonction phosphonate. Les deux dernières constantes de protonation ($\log K_{H3} = 3,78(4)$ et $\log K_{H4} = 3,02(5)$) correspondent à la protonation des acides carboxyliques présents sur les côtés (Figure 3.7).

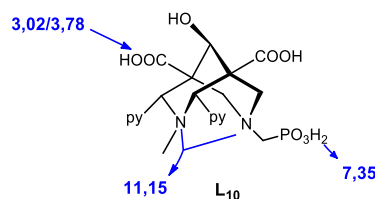


Figure 3.7 : Constante de protonation du ligand L_{10} .

Les études de stabilité en présence de zinc(II) et de manganèse(II) ont montré que la constante de formation du complexe ZnL_{10} ($\log K_{ZnL_{10}} = 16,54(4)$) est plus élevée que celle de MnL_{10} ($\log K_{MnL_{10}} = 13,72(3)$) et ce qui suit, de ce fait, la série d'Irving-Williams (Figure 3.8 a, b).

Pour les deux complexes, deux constantes de protonation ont été mesurées. Le premier $\log K_H$ de chaque complexe ($\log K_{MnLH} = 5,31(2)$ et $\log K_{ZnLH} = 5,43(3)$) correspond à la première protonation de la fonction phosphonate et le second ($\log K_{MnLH_2} = 3,90(1)$ et $\log K_{ZnLH_2} = 3,39(2)$) est attribué à la protonation d'une des fonctions carboxylates présent sur le squelette (Figure 3.8 a, b). Le diagramme de distribution du système MnL_{10} montre qu'à pH physiologique, l'espèce majoritaire est l'espèce MnL^{2-} (Figure 3.8 c).

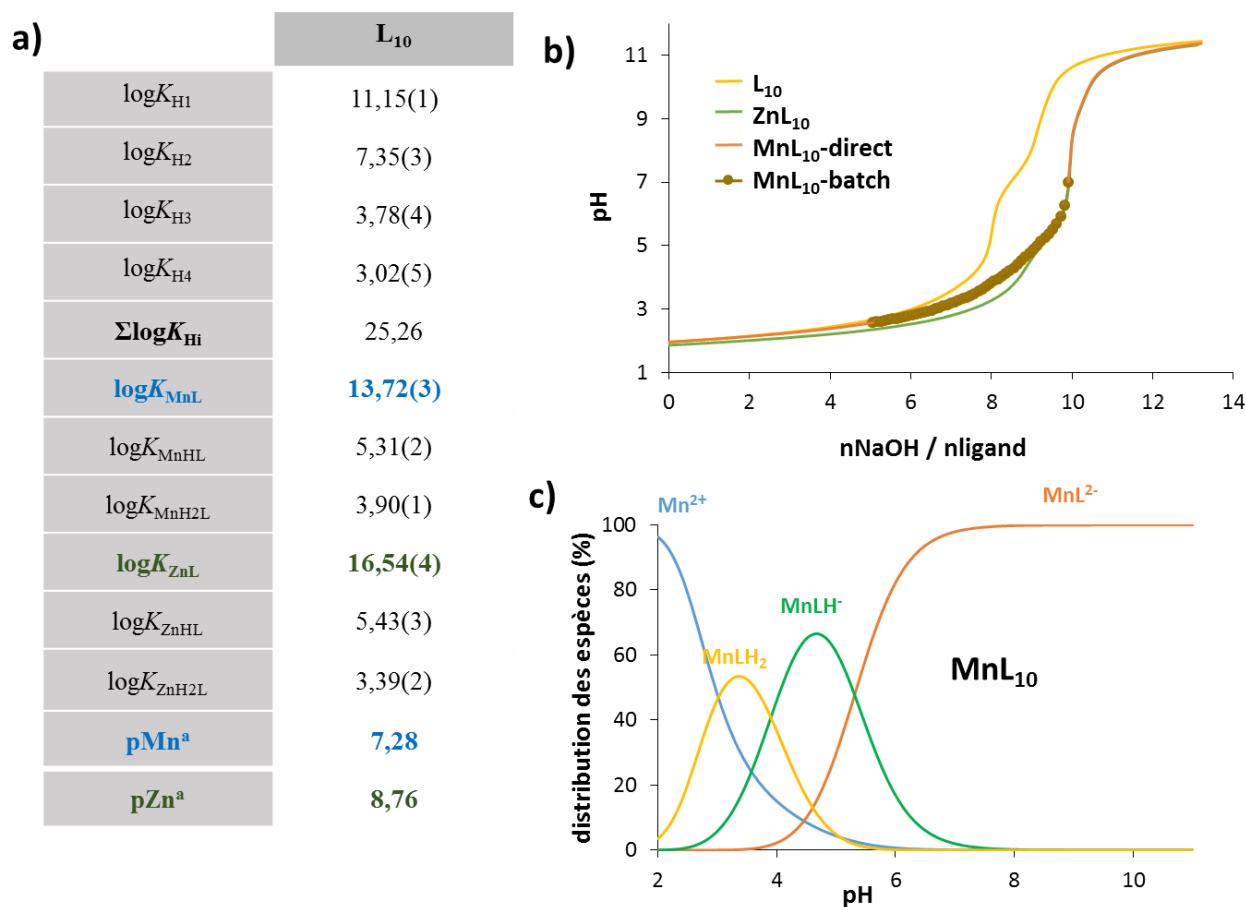


Figure 3.8 : a) Constante de protonation de L_{10} , constante de stabilité des complexes de zinc(II) et manganèse(II) et valeurs des pMn ($c_{Mn} = c_L = 10 \mu M$, $pH 7.4$). Les valeurs entre parenthèses sont les valeurs de déviation standard. b) Courbe de titrage potentiométrique de L_{10} en présence et en absence de métal. Conditions : $25 \text{ }^\circ C$, $0,15 M NaCl$, $c_L = c_M = 1,8 mM$. Pour les systèmes Mn : L les points correspondent à des titrages par « batch » et les courbes à des titrages directs. c) Diagramme de distribution du système MnL_{10} ($c_L = c_M = 1 mM$).

1.5. Conclusion

En conclusion, ces études de stabilité thermodynamique ont finalement permis d'établir les $\log K_H$ des différents ligands) et les constantes de stabilité des complexes. Si les ligands **L1**, **L4**, **L5**, **L6**, **L10** ainsi que leurs complexes présentent les constantes de protonation attendues pour un site de coordination chaise-chaise (Figure 3.9 a), les ligands **L7**, **L8** et leurs complexes présentent des $\log K_H$ supplémentaires à des pH basiques ce qui semble indiquer qu'à pH 7, une des deux amines tertiaires de la bispidine ne participe pas à la coordination du métal alors que les complexes avec les ligands **L7** et **L8** présentent des constante de stabilité plus élevées que les complexes avec **L5** et **L6**. Une des hypothèses qui permettrait d'expliquer ce résultat serait que les complexes des ligands **L7** et **L8** n'aient plus la même cavité de coordination que les autres et que ces derniers ne seraient pas sous une forme chaise-chaise sous une forme intermédiaire entre la conformation chaise-chaise et bateau-chaise de type enveloppe/déformé-chaise ou où la coordination du métal se ferait sur la face portant l'azote N3 . Ce nouveau site de coordination impliquerait donc l'azote N3, la fonction carboxylate en N3, les pyridines (une ou les deux) dont la coordination avec le métal a été confirmée par spectroscopie UV-visible du complexe **MnL7** (Thèse de Daouda Ndiaye, Université d'Orléans, 2021) et un ou deux des fonctions carboxylates présent sur les côtés de la bispidine. Ce site de coordination devrait au moins avoir un nombre de coordination d'au minimum cinq au vue des constantes de formation de ces complexes.

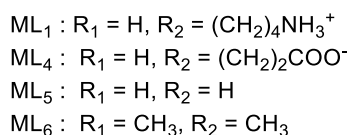
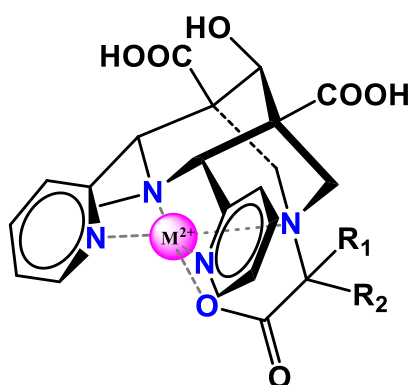


Figure 3.9 : a) Représentation tridimensionnelle des complexes de Mn^{2+} et Zn^{2+} avec les ligands **L1**, **L4**, **L5**, **L6** et **L10** (dans ce dernier cas la fonction carboxylate est remplacée par un groupement phosphonate).

Cette hypothèse permettrait aussi d'expliquer pourquoi les constantes de formation des systèmes ZnL_7 ($\log K_{ZnL_7} = 18,49$) et ZnL_8 ($\log K_{ZnL_8} = 17,59$) sont beaucoup plus élevées que celles des systèmes ZnL_5 ($\log K_{ZnL_5} = 13,72$) et ZnL_6 ($\log K_{ZnL_6} = 14,90$) car cette nouvelle cavité serait plus petite que la cavité chaise-chaise, elle correspondrait mieux à Zn^{2+} .

Dans l'ensemble, les constantes de stabilité de ces complexes de Mn^{2+} sont modestes. Le complexe MnL_8 possède la plus grande constante de stabilité de cette série avec un pMn de 8,48. Cette valeur est proche de celle de Mn -PyC3A ($pMn = 8,17$, $c_{Mn} = c_L = 10 \mu M$, $pH 7.4$)⁴ mais plus faibles que celle du complexe Mn -PC2A-EA ($pMn = 9,27$, $c_{Mn} = c_L = 10 \mu M$, $pH 7.4$)⁵ qui sont les deux complexes de Mn^{2+} les plus prometteurs comme agent de contraste. Bien que la stabilité thermodynamique permette de déterminer l'affinité d'un ligand pour un métal, ce n'est finalement pas le paramètre le plus significatif pour une application en IRM, qui utilise des complexes purifiés au préalable. En revanche, pour cette application, il est primordial de connaître le devenir d'un complexe lorsqu'il se trouve en présence d'éléments compétiteurs qui pourraient provoquer sa dissociation. Pour ce faire, l'inertie cinétique des complexes a été étudiée et le résultat de ces travaux sera présenté dans la prochaine partie.

2. Etude de l'inertie cinétique.

2.1. Objectif.

L'inertie cinétique de plusieurs complexes a été évaluée et les résultats seront présentés en trois parties. La première partie concernera les bispidines contenant des fonctions dérivées des acides aminés. Il s'agit des ligands **L1**, **L2** et **L3** qui ont des structures quasiment similaires. L'objectif est d'observer si les amines primaires et les acides carboxyliques présents sur le squelette et n'intervenant pas dans la coordination des ions métalliques jouent un rôle dans l'inertie du ligand en remplaçant ces derniers par une fonction amide et des fonctions alcools. La deuxième partie concernera les bispidines contenant des fonctions méthylèncarboxylates qui sont les ligands **L5**, **L6**, **L7** et **L8**. Ils se différencient par la présence de groupements méthyles ou non, par leur position et par le nombre de groupements donneurs. La troisième partie présentera enfin l'étude du ligand phosphonaté **L10** qui permettra d'évaluer la différence d'inertie cinétique entre un ligand phosphonaté ou carboxylaté (Figure 3.10).

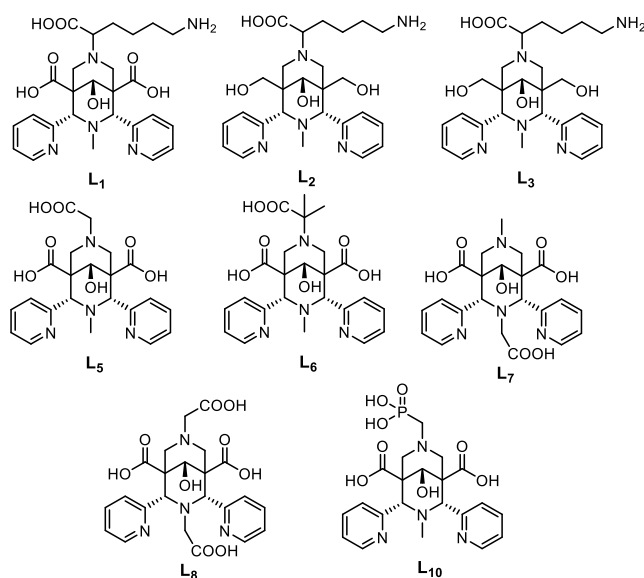


Figure 3.10 : Ligands discutés dans cette partie.

2.2. Définitions de l'inertie cinétique d'un complexe.

La dissociation d'un complexe dans le milieu biologique peut intervenir par différents mécanismes qui sont : la dissociation spontanée, acido-catalysée, métallo-assistée et éventuellement par l'assistance d'un ligand compétiteur.^{1,6} Afin d'obtenir des informations sur le mécanisme de dissociation des complexes, des réactions de transmétallation sont souvent réalisées. Ces études se font en présence d'un important excès d'ion métallique compétiteur afin de s'affranchir des variations de concentration de cet ion et de se placer ainsi dans des conditions de pseudo-premier ordre. Dans ces conditions, la constante de vitesse de pseudo-premier ordre k_{obs} peut être définie par l'équation 3.6 :

$$-\frac{d[\text{MnL}]_t}{dt} = k_{obs}[\text{MnL}]_t \quad \text{Equation 3.6}$$

où $[\text{MnL}]_t$ correspond à la concentration totale de complexe à l'instant t .

L'ion zinc(II) sera choisi ici comme compétiteur. Les études seront conduites à des pH variables afin d'augmenter/diminuer les cinétiques de dissociation et d'accéder dans certains cas à une estimation des différentes constantes de vitesse. Dans ces conditions et en considérant les différentes espèces présentes selon les spéciations déterminées ci-dessus et les constantes d'équilibre (K_{MnHL} , $K_{\text{MnH}_2\text{L}}$ et K_{MnLZn}), les différents mécanismes possibles (Figure 3.11) et leurs constantes de vitesse respectives (k_0 , k_1 , k_2 , k_3 et k_4), k_{obs} peut être décrit par l'équation 3.7 :

$$k_{obs} = \frac{k_0 + k_1[H^+] + k_2[H^+]^2 + k_3[Zn^{2+}] + k_4[Zn^{2+}][H^+]}{1 + K_{MnHL}[H^+] + K_{MnHL}K_{MnH_2L}[H^+]^2 + K_{MnLZn}[Zn^{2+}]}$$
Equation 3.7

Avec les constantes de vitesse caractérisant :

- k_0 : mécanisme de dissociation spontanée.
- k_1 : mécanisme de dissociation du complexe monoprotomé.
- k_2 : mécanisme de dissociation proton-assistée du complexe monoprotomé.
- k_3 : mécanisme de dissociation métal-assistée.
- k_4 : mécanisme de dissociation métal-assistée du complexe protoné.

Cette équation est une formule générale qui intègre tous les mécanismes de dissociation habituellement observés, mais ces différentes voies de dissociation ne sont pas nécessairement toutes actives pour un système donné.

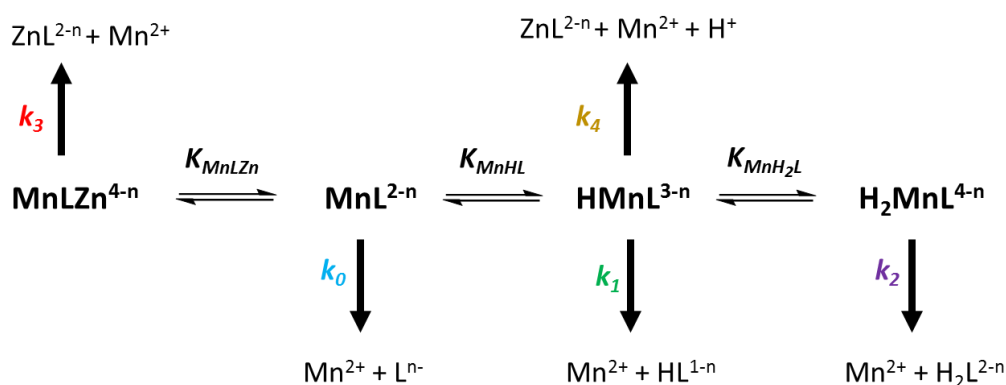


Figure 3.11 : Schéma général des mécanismes de décomplexation possibles des complexes de Mn²⁺.

Pour cette étude, les complexes ont d'abord été mis en présence de 50 équivalents de zinc (II) à 37 °C. La décomplexation a été suivie par relaxométrie au cours du temps et à différent pH. L'augmentation de la relaxivité traduit la libération du métal. Les courbes obtenues ont ensuite fait l'objet d'ajustements mathématiques sur MATLAB afin d'accéder aux valeurs de k_{obs} et du temps de demi-vie (dans des conditions de pseudo-premier ordre, $t_{1/2} = \ln(2)/k_{obs}$) en fonction du pH. Par la suite, pour certains systèmes, les courbes des valeurs de k_{obs} en fonction du pH ont aussi été ajustées sur MATLAB afin d'obtenir les constantes de vitesse de l'équation 3.7.

2.3. Etudes des bispidines avec un bras dérivé des acides aminés.

L'étude de transmétallation (Figure 3.12) a montré qu'à pH 3, les temps de demi-vie de MnL_1 , MnL_2 et MnL_3 sont de 22 h, 21,06 h et 9,62 h, respectivement (Tableau 3.1). On observe donc une importante diminution de l'inertie cinétique avec le complexe MnL_3 . A pH 3,75, les temps de demi-vie sont de 10 jours, 6,63 jours et 4,01 jours pour MnL_1 , MnL_2 et MnL_3 respectivement. Le complexe MnL_1 est donc beaucoup plus inerte que les deux autres à partir de ce pH. Cette tendance est confirmée à pH 5 où un temps de demi-vie de 137 j a été obtenu contre 36,47 j et 47,19 j pour MnL_2 et MnL_3 respectivement. A pH 6, aucune dissociation n'est observée après plus de 140 jours pour MnL_1 tandis que pour MnL_2 et MnL_3 des augmentations de la relaxivité sont bien observées, mais elles sont encore trop faibles pour permettre le calcul du k_{obs} (Tableau 3.1). Ainsi, sur les trois systèmes, le complexe MnL_1 est le plus inerte cinétiquement, ce qui montre que, bien que les fonctions acides carboxyliques et la fonction amine ne participent pas à la sphère de coordination,² elles sont de grande importance pour l'inertie du complexe.

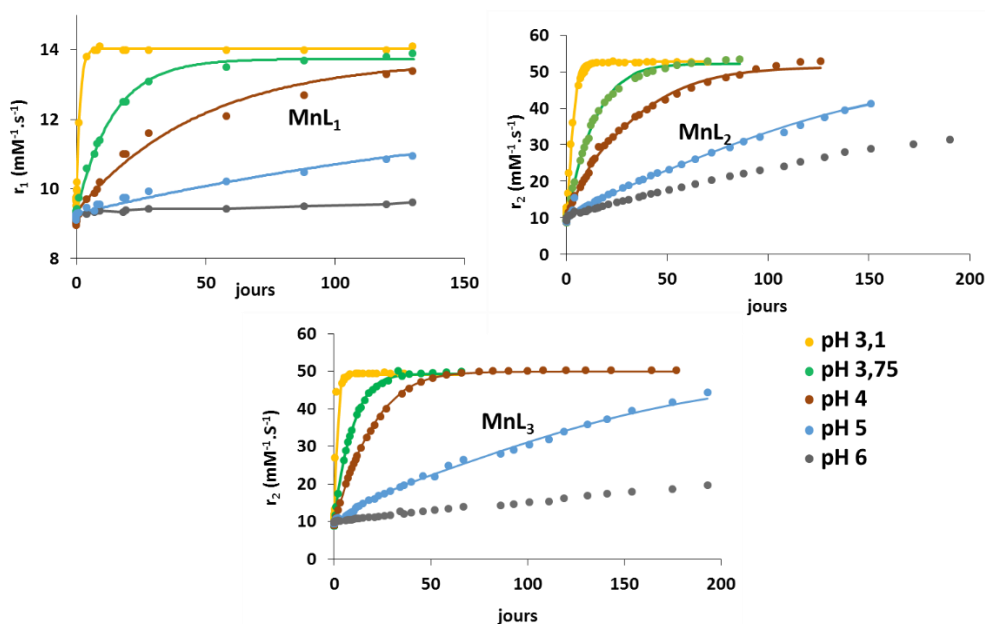


Figure 3.12 : Variation des relaxivités longitudinales (r_1) ou transversales (r_2) des complexes MnL_1 , MnL_2 et MnL_3 ($c_{MnL} = 0,85-1 \text{ mM}$ $0,1 \text{ M NaCl}$ (ou KCl), $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 60 MHz) en fonction du temps, en présence de 50 équivalents de Zn^{2+} et à pH 3 (tampon KHP, $0,05 \text{ mM}$), pH 3,75 (tampon DMP, $0,03 \text{ mM}$), pH 4 (tampon DMP, $0,03 \text{ M}$), pH 5 (tampon NMP, $0,03 \text{ M}$) et pH 6 (tampon MES $0,03 \text{ M}$). Les points correspondent aux valeurs expérimentales et les courbes aux ajustements mathématiques des données expérimentales.

Complexes	$k_{obs} \times 10^{-6} \text{ (s}^{-1}) / t_{1/2}$ (pH 3,1)	$k_{obs} \times 10^{-6} \text{ (s}^{-1}) / t_{1/2}$ (pH 3,75)	$k_{obs} \times 10^{-6} \text{ (s}^{-1}) / t_{1/2}$ (pH 4,1)	$k_{obs} \times 10^{-6} \text{ (s}^{-1}) / t_{1/2}$ (pH 5,1)	$k_{obs} \times 10^{-6} \text{ (s}^{-1}) / t_{1/2}$ (pH 6,0)
MnL ₁	8,47(3) / 22 h	0,82(1) / 10 j	0,24(1) / 33 j	0,06(1) / 137 j	Pas de dissociation*
MnL ₂	9,14(3) / 21,06 h	1,21(2) / 6,63 j	0,66(1) / 12,16 j	0,22(3) / 36,47 j	0,11(2) / -
MnL ₃	20,02(5) / 9,62 h	2,01(2) / 4,01 j	0,80(1) / 10,03 j	0,17(3) / 47,19 j	0,05(2) / -

Tableau 3.1 : Constantes de vitesse de pseudo-premier ordre k_{obs} et temps de demi-vie des complexes MnL₁, MnL₂ et MnL₃ ($c_{MnL} = 0,85-1 \text{ mM}$, $0,1 \text{ M NaCl}$ (ou KCl), $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 60 Hz) à pH 3 (tampon KHP, $0,05 \text{ mM}$), pH 3,75 (tampon DMP, $0,03 \text{ mM}$), pH 4 (tampon DMP, $0,03 \text{ M}$), pH 5 (tampon NMP, $0,03 \text{ M}$) et pH 6 (tampon MES $0,03 \text{ M}$).

Afin d'étudier la dépendance du Zn^{2+} dans le mécanisme de dissociation du complexe MnL₁, des études de transmétallation ont été effectuées en faisant varier le nombre d'équivalents de Zn^{2+} à deux pH différents. Cette étude a montré que pour MnL₁, la valeur du k_{obs} ne variait pas significativement en fonction de la quantité de Zn^{2+} , ce qui signifie que la dépendance de Zn^{2+} est négligeable par rapport à celle du pH (Figure 3.13, d).

Pour déterminer les valeurs des constantes caractérisant les différents mécanismes, il faut ajuster mathématiquement les courbes décrivant la variation du k_{obs} en fonction du pH avec l'équation 3.7. Comme la dépendance de Zn^{2+} est négligeable, les courbes de la variation du k_{obs} en fonction du pH du complexes MnL₁ et de ses analogues MnL₂ et MnL₃ (Figure 3.13, a, b et c) ont été ajustées sur MATLAB avec l'équation simplifiée 3.8 :

$$k_{obs} = k_0 + k_1[H]^+ + k_2[H^+]^2 \quad \text{Equation 3.8}$$

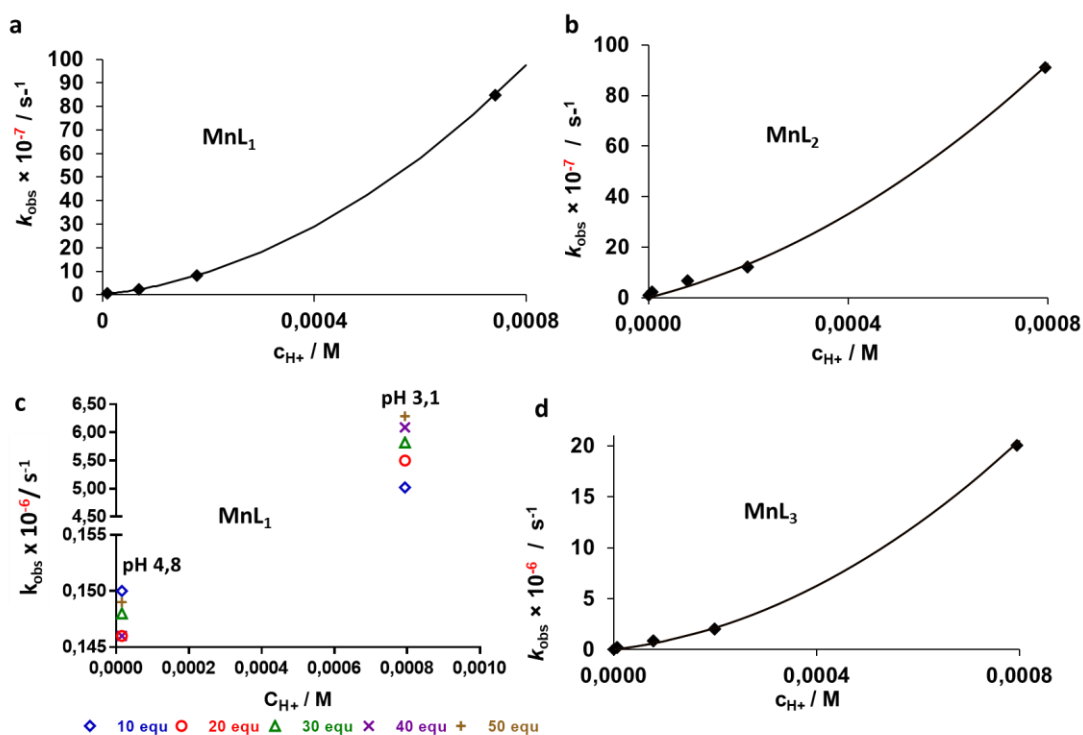


Figure 3.13 : Variation de la constante de pseudo-premier ordre k_{obs} des complexes MnL_1 , MnL_2 et MnL_3 à 37 °C en fonction a), b), d) de la concentration en proton et c) de la quantité de Zn^{2+} (MnL_1 , $c_{MnL} = 1mM$) à pH 3,1 (tampon KHP, 0,05 mM) et 4,8 (tampon NMP, 0,03 M). Les courbes correspondent aux ajustements mathématiques des k_{obs} .

Pour les trois complexes, les constantes k_0 (caractérisant la dissociation spontanée) ont été fixées à 0 car leurs ajustements conduisaient à des valeurs négatives et les constantes de vitesse k_2 (caractérisant la dissociation proton-assistée du complexe protoné) conduisaient à des valeurs avec de larges erreurs et n'ont donc pas été reportées ici. Ainsi, seules les valeurs des constantes k_1 caractérisant la dissociation proton-assistée des complexes sont présentées dans le tableau 3.2. Les constantes k_1 de ces trois complexes sont plus petites de deux ordres de grandeur que celle de Mn-PC2EA ($k_1 = 0,6 M^{-1}s^{-1}$)⁵ qui est un des complexes monohydratés les plus inertes. Elles sont aussi plus petites d'un ordre de grandeur que la constante k_1 de Mn-DOTA ($k_1 = 0,04 M^{-1}s^{-1}$)⁷, qui est le complexe de Mn^{2+} non hydraté le plus inerte.

Complexes	MnL_1	MnL_2	MnL_3
$k_1 \times 10^{-3} (s^{-1}M^{-1})$	2,2(2)	4,9(2)	5,5(2)

Tableau 3.2 : Constantes de vitesse k_1 caractérisant la dissociation proton-assistée des complexes MnL_1 , MnL_2 et MnL_3 (37 °C, 0,1 M NaCl (ou KCl)).

Pour MnL_1 , une étude de décomplexation à très bas pH, où la dissociation est très rapide, a aussi été réalisée. Les constantes k_{obs} obtenues en fonction du pH ont ensuite fait l'objet d'un ajustement mathématique avec le logiciel MATLAB (Figure 3.14). La dissociation montre une dépendance du second ordre en fonction de la concentration en proton qui peut être modélisée par l'équation 3.8. Ici encore, la constante k_0 a été négligée car l'ajustement conduisait à des valeurs négatives avec une grande erreur. Des constantes k_1 et k_2 égales à $1,6(1)\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ et $5,0(1)\times 10^{-4} \text{ s}^{-1}\text{M}^{-2}$, respectivement, ont pu être calculées. La constante k_1 se situe dans le même ordre de grandeur que celle déterminée par l'étude de transmétallation, ce qui conforte donc ce résultat.

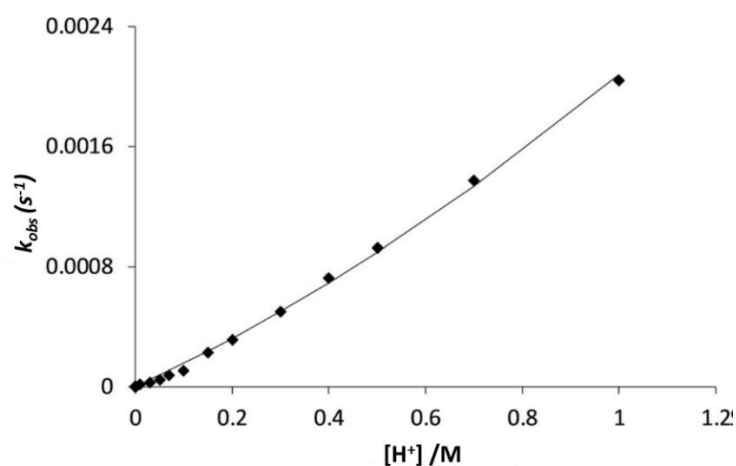


Figure 3.14 : Variation de la constante de vitesse de pseudo-premier ordre k_{obs} en fonction de la concentration en proton ($c_{\text{MnL}} = 1 \text{ mM}$, HCl 0,01-0,1 M, $I = 1 \text{ M}$ ($\text{KCl} + \text{HCl}$), $25 \text{ }^\circ\text{C}$). La courbe correspond à l'ajustement mathématique des données expérimentales à l'équation 3.8.

2.4. Etudes des bispidines avec un bras dérivé du méthylèncarboxylate.

Les études de transmétallation (Figure 3.15) montrent qu'à pH 3, MnL₆ présente la plus haute inertie cinétique avec un temps de demi-vie de 2,46 j contre 13,44 h, 0,48 h et 0,37 h pour MnL₅, MnL₇ et MnL₈ respectivement. A pH 3,75, MnL₅ et MnL₆ ont des temps de demi-vie proches ($t_{1/2} = 2,51$ j et $t_{1/2} = 2,91$ j respectivement), tandis que les temps de demi-vie de MnL₇ et MnL₈ sont beaucoup plus faibles ($t_{1/2} = 1,09$ h et $t_{1/2} = 0,85$ h respectivement). A pH 4,1, le complexe MnL₆ est toujours le plus inerte et présente un temps de demi-vie de 9,32 j contre 4,48 j, 2,52 h, et 1,44 h pour MnL₅, MnL₇ et MnL₈ respectivement. A pH 5, c'est MnL₅ qui est le plus inerte avec un temps de demi-vie de 72,93 j contre 47,19 j, 26,87 h et 14,81 h pour MnL₆, MnL₇ et MnL₈ respectivement. Une inversion de l'inertie cinétique entre MnL₅ et MnL₆ est donc observée. Ceci peut être expliqué par la différence de $\log K_{MHL}$ entre les deux complexes. En effet, le $\log K_{MHL}$ de MnL₅ ($\log K_{MnLH} = 3,20$) est plus faible que celui de MnL₆ ($\log K_{MnLH} = 4,52$), ce qui signifie qu'à ce pH, MnL₆ présente une proportion plus élevée de l'espèce protonée MnLH, que MnL₅ ce qui favorise la décomplexation proton-assistée. A pH 6, pour MnL₅ et MnL₆, la variation de la relaxivité est encore trop faible pour permettre le calcul des constantes k_{obs} après 150 jours, ce qui traduit une inertie cinétique très élevée. Dans le cas des complexes MnL₇ et MnL₈, l'inertie cinétique est beaucoup plus faible, des temps de demi-vie de 1,48 j et de 3,85 j respectivement, ont été obtenus (Tableau 3.3).

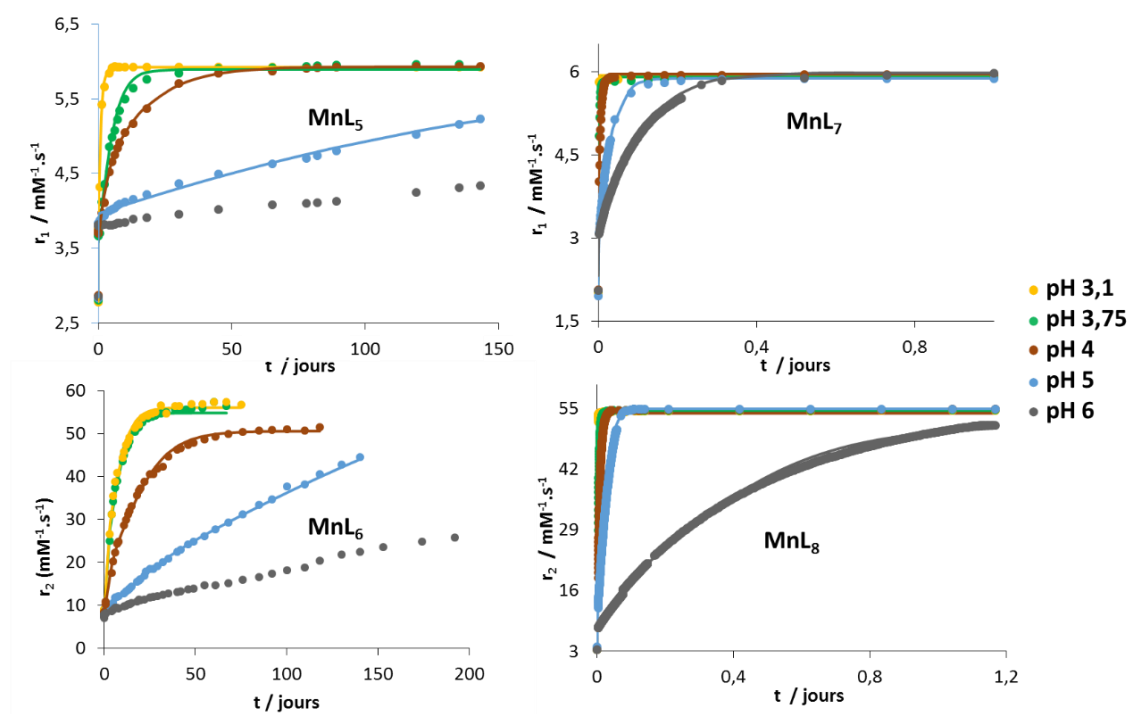


Figure 3.15 : Variation des relaxivités longitudinales (r_1) ou transversales (r_2) des complexes MnL_5 , MnL_6 , MnL_7 et MnL_8 ($c_{MnL} = 0,85-1$ mM, $0,1$ M NaCl, 37 °C, 60 MHz) en fonction du temps, en présence de 50 équivalents de Zn^{2+} , à pH 3 (tampon KHP, $0,05$ mM), pH 3,75 (tampon DMP, $0,03$ mM), pH 4 (tampon DMP, $0,03$ M), pH 5 (tampon NMP, $0,03$ M) et pH 6 (tampon MES $0,03$ M). Les points correspondent aux valeurs expérimentales et les courbes aux ajustements mathématiques des données expérimentales

Complexes	$k_{obs} \times 10^{-6}$ (s ⁻¹) / $t_{1/2}$ (pH 3,1)	$k_{obs} \times 10^{-6}$ (s ⁻¹) / $t_{1/2}$ (pH 3,75)	$k_{obs} \times 10^{-6}$ (s ⁻¹) / $t_{1/2}$ (pH 4,1)	$k_{obs} \times 10^{-6}$ (s ⁻¹) / $t_{1/2}$ (pH 5,1)	$k_{obs} \times 10^{-6}$ (s ⁻¹) / $t_{1/2}$ (pH 6,0)
MnL_5	14,33(4) / 13,44 h	3,2(2) / 2,51 j	1,79(2) / 4,48 j	0,11(5) / 72,93 j	0,03(2) / -
MnL_6	3,26(3) / 2,46 j	2,76(2) / 2,91 j	0,86(1) / 9,32 j	0,17(2) / 49,19 j	0,13(1) / -
Complexes	$k_{obs} \times 10^{-3}$ (s ⁻¹) / $t_{1/2}$ (pH 3,1)	$k_{obs} \times 10^{-3}$ (s ⁻¹) / $t_{1/2}$ (pH 3,75)	$k_{obs} \times 10^{-3}$ (s ⁻¹) / $t_{1/2}$ (pH 4,1)	$k_{obs} \times 10^{-3}$ (s ⁻¹) / $t_{1/2}$ (pH 5,1)	$k_{obs} \times 10^{-3}$ (s ⁻¹) / $t_{1/2}$ (pH 6,0)
MnL_7	23,88(4) / 0,48 h	10,63(2) / 1,09 h	4,58(2) / 2,52 h	0,43(5) / 26,87 h	0,13(1) / 1,48 j
MnL_8	31,29(3) / 0,37 h	13,54(2) / 0,85 h	8,01(2) / 1,44 h	0,78(1) / 14,81 h	0,05(1) / 3,85 j

Tableau 3.3 : Constantes de stabilité de pseudo-premier ordre k_{obs} et temps de demi-vie des complexes MnL_5 , MnL_6 , MnL_7 et MnL_8 ($c_{MnL} = 0,85-1$ mM, $0,1$ M NaCl, 37 °C) à pH 3 (tampon KHP, $0,05$ mM), pH 3,75 (tampon DMP, $0,03$ mM), pH 4 (tampon DMP, $0,03$ M), pH 5 (tampon NMP, $0,03$ M) et pH 6 (tampon MES $0,03$ M).

Globalement, trois ordres de grandeur séparent les k_{obs} des complexes MnL₅ et MnL₆ de ceux des complexes MnL₇ et MnL₈. Cette différence d'inertie est probablement due aux différents mécanismes impliqués dans la dissociation des complexes. Ceci est d'autant plus probable que les études potentiométriques présentées ci-dessus avaient émis l'hypothèse de modes de coordination différents pour les deux familles de complexes. En effet, grâce aux courbes présentant les constantes k_{obs} en fonction du pH, on observe que la courbe de MnL₅ décrit une évolution linéaire qui dépend uniquement du pH (Figure 3.16 a). La constante de vitesse k_1 a donc pu être estimée (Equation 3.8) et elle est de $1,79(5) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (37 °C, 0,1 M NaCl). La constante k_1 de MnL₆ n'a pas pu être déterminée lors de cette étude car les deux premières valeurs de pH avaient des k_{obs} trop proches pour permettre le calcul du k_1 . Une étude de transmétallation à un pH plus élevé devra donc être réalisée afin d'avoir suffisamment de points pour le calcul des constantes de vitesse. Toutefois, dans l'attente de ces résultats et en considérant que les constantes k_{obs} de MnL₆ se situent dans le même ordre de grandeur que celles de MnL₅, on peut supposer que les deux complexes suivent le même mécanisme de dissociation.

Dans le cas de MnL₇ et MnL₈ (Figure 3.16 b, c), les courbes décrivent une allure qui diffère de celle de MnL₅ mais aussi des complexes MnL₁, MnL₂ et MnL₃. En réalisant une étude sur la variation du k_{obs} en fonction de la quantité de zinc(II) à deux pH différents, une diminution significative du k_{obs} (d'environ 10^{-2} s^{-1}) a été observée lorsque la quantité de zinc(II) a été augmentée (Figure 3.16 d). Cette tendance traduit la formation de l'espèce binucléaire MnLZn, dont la concentration augmente avec la quantité de zinc(II), et qui se dissocie plus lentement que l'espèce protonée ; donc sa formation ralentit la dissociation.⁸ Pour ces deux complexes, le calcul des constantes de vitesse caractérisant les différentes voies de dissociation nécessite de réaliser une étude plus poussée sur la variation du k_{obs} (à plusieurs valeurs de pH) et ces dernières n'ont donc pas pu être calculées.

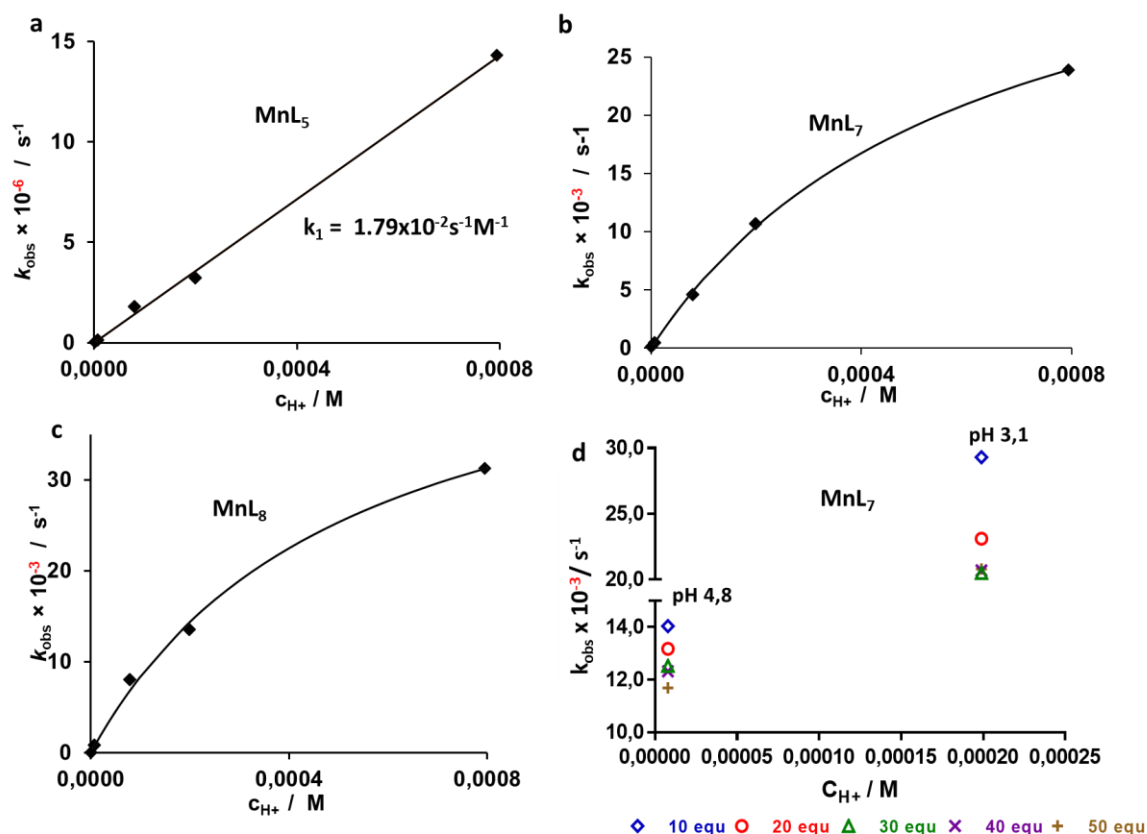


Figure 3.16 : Variation de la constante de pseudo-premier ordre k_{obs} des complexes a) MnL_5 , b) MnL_7 et c) MnL_8 à 37 °C en fonction de la concentration en proton et d) de la quantité de Zn^{2+} (MnL_7) à pH 3,1 (tampon KHP, 0,05 mM) et 4,8 (tampon NMP, 0,03 M). Les droites correspondent aux ajustements mathématiques des k_{obs} .

En conclusion, si les complexes MnL_5 et MnL_6 présentent des inerties cinétiques très élevées et un mécanisme de dissociation proton-assisté qui est dominant, dans le cas de MnL_7 et MnL_8 , il semble que le zinc(II) soit significativement impliqué. Bien que les constantes k_1 des complexes MnL_7 et MnL_8 n'ont pas pu être déterminés, elles doivent être certainement plus élevées que celles des autres complexes. En considérant l'hypothèse d'un nouveau site de coordination impliquant les acides carboxyliques présents sur les côtés, on pourrait supposer que la protonation des fonctions carboxylates qui participent à la coordination du manganèse pour MnL_7 et MnL_8 (et non pour MnL_5 et MnL_6) accélère la décomplexation proton-assistée par rapport aux autres complexes, ce qui serait la raison de cette inertie 1000 fois plus faible.

2.5. Etudes de la bispidine avec un bras phosphonaté MnL₁₀.

Les temps de demi-vie de MnL₁₀ sont de 7,72 h, 1,84 j, 3,27 j et 28,65 j à pH 3, 3,75, 4 et 5 respectivement (Figure 3.17 a et c). Comme pour les autres systèmes, la variation de la relaxivité à pH 6 était trop lente pour permettre le calcul du k_{obs} . Lors de l'ajustement mathématique de la courbe du k_{obs} en fonction du pH (Figure 3.17, b) une valeur négative de k_0 a été obtenue avec une grande erreur et ce dernier a donc été fixée à 0. De même, les constantes k_3 et k_4 ont aussi été négligées car elles étaient obtenues avec de grandes erreurs. Ainsi, une constante de vitesse k_1 de $2,11(5) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a donc été calculée avec l'équation 3.8. Le complexe MnL₁₀ est moins inerte que son analogue carboxylate. Cette différence est surtout visible à pH 5 ($t_{1/2}(\text{MnL}_{10}) = 28,65 \text{ j}$ contre $t_{1/2}(\text{MnL}_5) = 72,93 \text{ j}$). Ceci peut être attribué à la basicité de la seconde protonation du phosphonate qui augmente la proportion d'espèce protonée à ce pH, favorisant ainsi la dissociation proton-assistée. Un exemple similaire a déjà été décrit avec le complexe Mn-12pyN4 et son analogue phosphonaté Mn-12pyN4P pour lesquels l'inertie cinétique du complexe phosphonaté était trop faible pour être mesurée tandis que pour Mn-12pyN4A, un temps de demi-vie de 6 min a été déterminé (pH 6, Zn²⁺, 10 éq).⁶

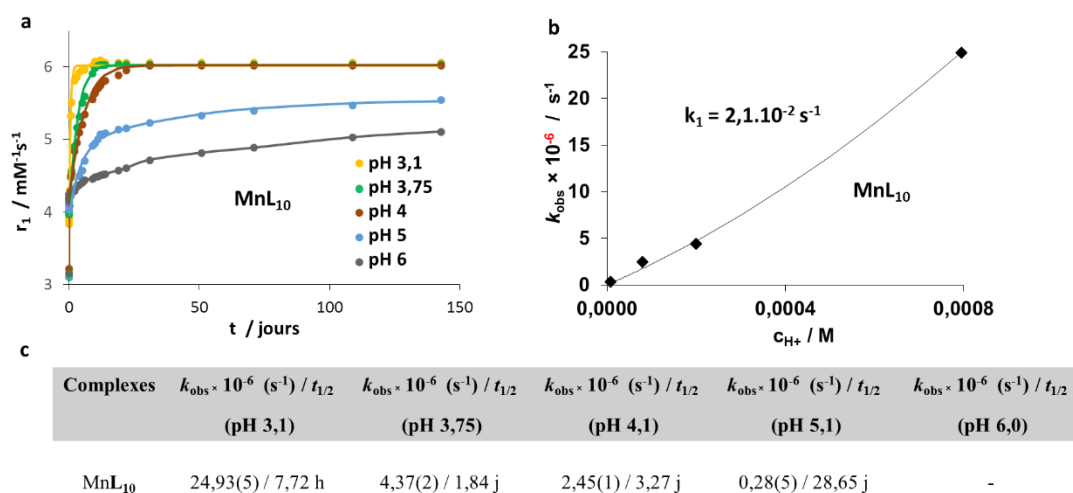


Figure 3.17 : a) Variation des relaxivités longitudinales (r_1) du complexe MnL₁₀ en fonction du temps, en présence de 50 équivalents de Zn²⁺ et à différents pH ($c_{\text{MnL}} = 1 \text{ mM}$, 37 °C, 60 MHz). Les points correspondent aux valeurs expérimentales et les courbes aux ajustements mathématiques des données expérimentales. b) Variation de la constante de pseudo-premier ordre k_{obs} du complexe MnL₁₀ ($c_{\text{MnL}} = 1 \text{ mM}$, 37 °C) en fonction de la concentration en proton.

2.6. Conclusion

Finalement, le complexe MnL₁ se distingue par une inertie cinétique exceptionnelle. A pH 6, aucune démétallation n'a été observée pendant plus de 140 jours en présence de 50 équivalents de Zn²⁺. Les complexes MnL₂, MnL₃, MnL₄, MnL₅ et MnL₆ présentent aussi des inerties cinétiques élevées avec des constantes de vitesse de dissociation se situant tous dans le même ordre de grandeur (10⁻⁶ s⁻¹). Les complexes MnL₇ et MnL₈ sont 1000 fois moins inertes que les autres complexes de cette série, ce qui démontre que la présence de la fonction carboxylate en N3 n'est pas favorable à l'inertie cinétique, probablement à cause du changement de conformation qu'elle entraîne. Néanmoins, même ces complexes, qui sont les moins inertes, ont des vitesses de décomplexation inférieures à la majorité des complexes décrits dans la littérature.^{9,10} Par exemple, dans les mêmes conditions, à pH 6, le temps de demi-vie du complexe Mn-PyC3A est de 17,08 min ($k_{obs} = 6,76 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$)⁴ et celui de MnPC2A-EA est de 54,4 h ($k_{obs} = 3,54 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$).⁵

3. Etude de la relaxivité.

Pour rappel, la relaxivité correspond à l'augmentation de la vitesse de relaxation des protons de l'eau induite par 1 mM d'ion paramagnétique et permet donc de quantifier l'efficacité d'un agent de contraste. Dans un premier temps, la relaxivité de tous les complexes a été mesurée dans l'eau pure à 60 MHz et à 25 °C. Ensuite parmi les différents analogues, des complexes ont été étudiés en relaxométrie (profil NMRD) et en RMN de l'oxygène 17 afin de déterminer les paramètres qui régissent la relaxivité selon la théorie de SBM (voir Chapitre I, théorie de la relaxivité). Comme pour les parties précédentes, la présentation de ces travaux se fera en trois sous-parties. La première abordera les études de relaxivité des complexes avec des bispidines possédant un bras dérivé des acides aminés, la deuxième présentera les études des complexes avec des bispidines présentant un bras dérivé du méthylèncarboxylate et la troisième concernera l'étude du complexe phosphonaté MnL₁₀.

3.1. Etudes des complexes avec des bispidines possédant un bras dérivé des acides aminés.

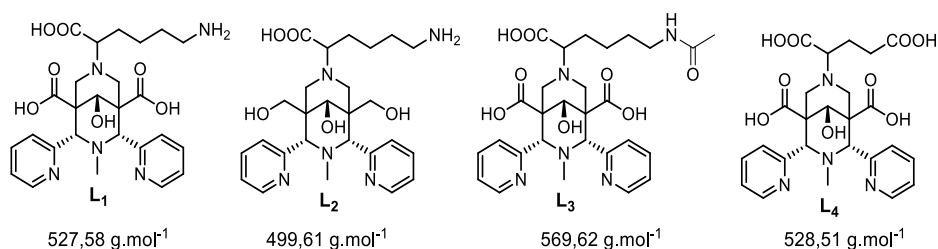


Figure 3.18 : Structures des ligands discutés dans cette partie avec leurs poids moléculaires.

Les complexes MnL_1 et MnL_3 ont des relaxivités de $4,14 \text{ mM.s}^{-1}$ et de $4,03 \text{ mM.s}^{-1}$ (60 MHz, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, Figure 3.19) respectivement. Leurs relaxivités sont très proches, il semble donc que la substitution de l'amine par un amide n'ait pas de grande influence sur la relaxivité. Les complexes MnL_2 et MnL_4 présentent des relaxivités plus faibles de $3,71 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$ et de $3,79 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$ (60 MHz, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, Figure 3.18) respectivement. Les profils NMRD et les relaxivités transversales de ^{17}O en fonction de la température (Figure 3.20) des complexes MnL_1 , MnL_2 et MnL_4 ont été mesurés. Les profils NMRD présentent une allure classique des complexes de petite taille qui peut être reproduite de manière satisfaisante en appliquant la théorie de SBM (Figure 3.18). Les valeurs des paramètres utilisées pour ces ajustements sont rassemblées au Tableau 3.4. Les relaxivités de ces complexes diminuent lorsque la température augmente ; ceci montre que la relaxivité est limitée par le temps de corrélation rotationnelle τ_{RH} du complexe et non pas par la vitesse d'échange de la molécule d'eau dans la première sphère de coordination.¹¹

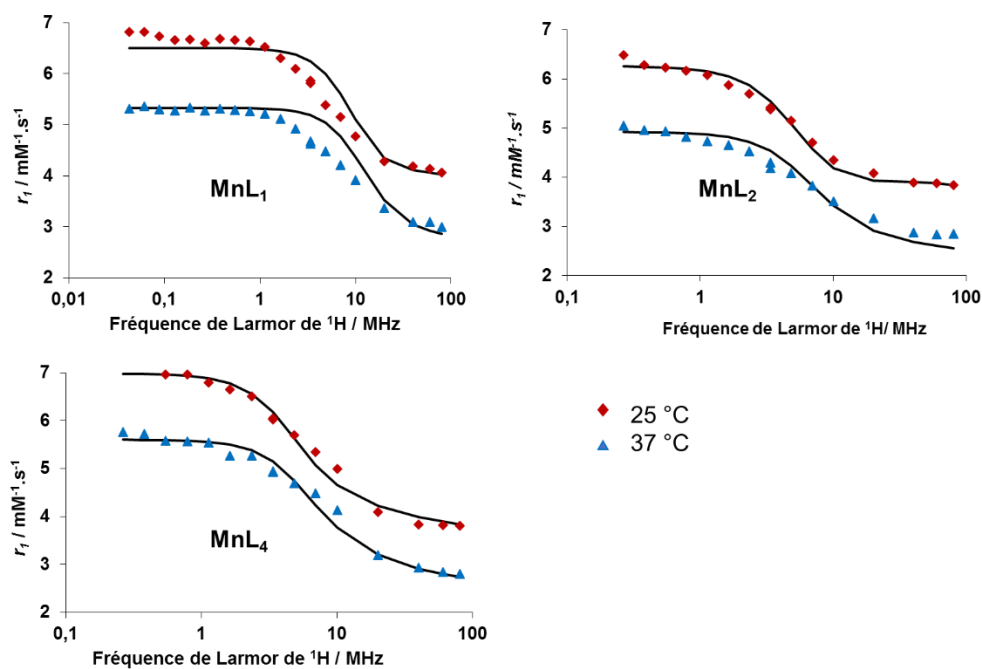


Figure 3.19 : Profils NMRD des complexes MnL_1 ($c_{MnL_1} = 1,6 \text{ mM}$), MnL_2 ($c_{MnL_2} = 1,2 \text{ mM}$) et MnL_4 ($c_{MnL_4} = 1,1 \text{ mM}$) à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ et $37 \text{ }^\circ\text{C}$ dans l'eau ($\text{pH } 7,4$). Les points correspondent aux valeurs expérimentales et les lignes aux ajustements mathématiques des données expérimentales.

Complexes	MnL_1	MnL_2	MnL_3	MnL_4
$r_1(\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}), 60 \text{ MHz}, 25^\circ\text{C}$	4,14	3,71	4,03	3,81
$k_{\text{ex}}^{298} (10^7 \text{ s}^{-1})$	5,1(7)	7,4(2)	-	11,9(1)
$\Delta H^\ddagger (\text{kJ}.\text{mol}^{-1})$	10,6 (1)	3,5(4)	-	5,6(2)
$\Delta S^\ddagger (\text{kJ}.\text{mol}^{-1})$	-62(3)	-49(12)	-	-71(6)
$E_{\text{rH}} (\text{kJ}.\text{mol}^{-1})$	22(1)	30(2)	-	23(2)
$\tau_{\text{rH}}^{298} (\text{ps})$	100(5)	93(2)	-	94(3)
$\tau_{\text{v}}^{298} (\text{ps})$	24(10)	18(2)	-	30(3)
$\Delta^2 (10^{-19} \text{ s}^{-2})$	0,8(1)	1,1(2)	-	0,49
$A_0/\hbar (10^6 \text{ rad}.\text{s}^{-2})$	28,0(1)	28,9(2)	-	26

Tableau 3.4 : Relaxivités et paramètres caractérisant l'échange d'eau, la rotation et la relaxation électronique des complexes MnL_1 , MnL_2 et MnL_4 obtenus par les ajustements mathématiques simultanés des données expérimentales des profils NMRD (à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ et $37 \text{ }^\circ\text{C}$) et de la vitesse de relaxation transversale réduite de ^{17}O (400 MHz).

Ces profils ont été couplés avec des études de RMN dans l'eau enrichie en ^{17}O qui ont permis d'estimer le nombre d'hydratation q du complexe. En effet, Gale et al.¹² ont montré qu'il était possible de d'estimer le nombre q de molécule d'eau dans la première sphère de coordination d'un complexe de manganèse(II) avec une erreur de 20 % avec la relation :

$$q = \frac{r_{2max}^0}{510} \quad \text{Equation 3.9}$$

Où r_{2max}^0 correspond au maximum de la relaxivité transversale de l'oxygène ^{17}O .

En appliquant cette équation au complexe MnL_1 ($r_{2max}^0 = 431 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) et MnL_2 ($r_{2max}^0 = 435 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) des nombres d'hydratations q de 0,85 et de 0,85 ont été obtenus respectivement. En considérant l'erreur de 20 % et les valeurs de relaxivité des deux complexes, il est possible de dire sans ambiguïté que les complexes MnL_1 et MnL_2 présentent une molécule dans leur première sphère de coordination. Les complexes MnL_1 et MnL_2 présentent des temps de corrélation rotationnelle τ_{rH} similaire avec $\tau_{\text{rH}} = 100(5) \text{ ps}$ et $\tau_{\text{rH}} = 93(2) \text{ ps}$ pour MnL_1 et MnL_2 respectivement (Tableau 3.4). Bien qu'un faible écart de relaxivité soit observé entre les deux complexes, ceci peut difficilement être attribué au retrait d'une seconde sphère par la réduction des fonctions carboxylates en alcool car la diminution est bien trop faible.

Un nombre d'hydratation plus faible, égal à 0,59 ($r_{2max}^0 = 303 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), a été obtenu pour MnL_4 . Ce résultat ne reste qu'une estimation et, au vu de la relaxivité élevée de MnL_4 , l'ajustement mathématique simultané des données expérimentales a été réalisé en fixant $q = 1$ et la constante de couplage scalaire $A_0/\hbar = 28 \times 10^6 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-2}$.

Les constantes de vitesse d'échange de l'eau en première sphère, k_{ex}^{298} , sont directement obtenues à partir des vitesses de relaxation transversales réduites de ^{17}O . La vitesse d'échange de MnL_1 ($k_{\text{ex}}^{298} = 5,1 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$) est plus petite que celle de MnL_2 ($k_{\text{ex}}^{298} = 7,4 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$) et que celle de MnL_4 ($k_{\text{ex}}^{298} = 9,1 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$) (Tableau 3.4). Dans tous les cas, cette vitesse est suffisamment élevée pour ne pas avoir d'influence sur la relaxivité car c'est le temps de corrélation rotationnelle qui est limitant pour ces systèmes.

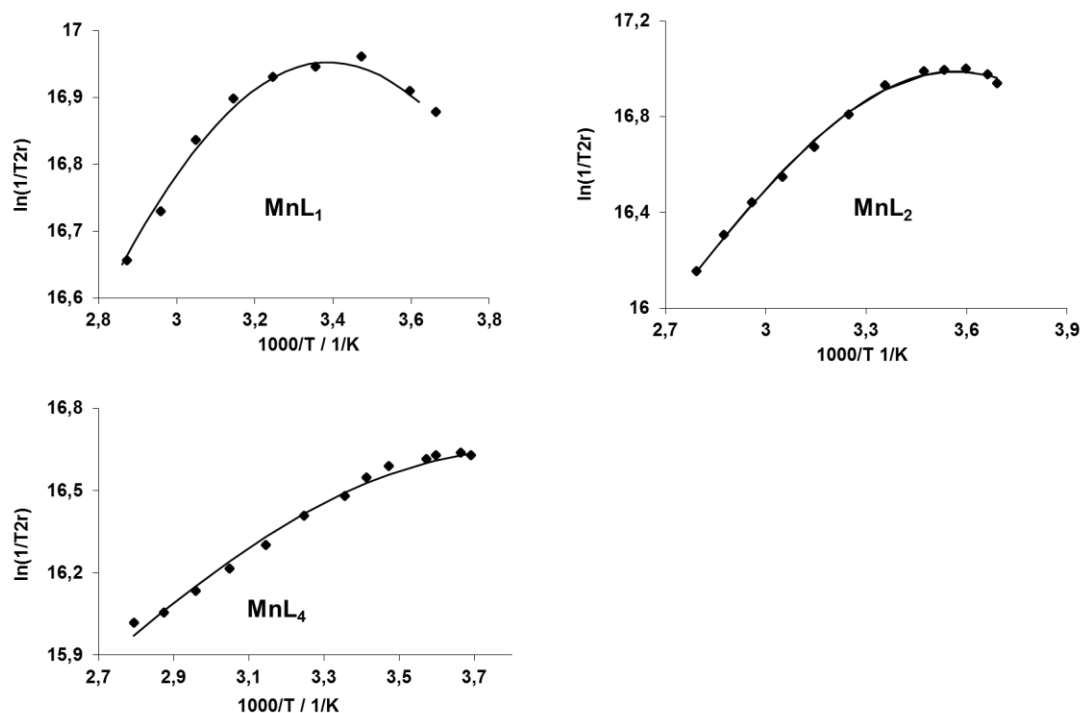


Figure 3.20 : Vitesses de relaxation transversale réduites de ^{17}O (400 MHz) de MnL_1 ($c_{\text{MnL}_1} = 3,4 \text{ mmol.kg}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$), MnL_2 ($c_{\text{MnL}_2} = 3,4 \text{ mmol.kg}^{-1}$, $\text{pH} = 7,2$) et MnL_4 ($c_{\text{MnL}_1} = 3,6 \text{ mmol.kg}^{-1}$, $\text{pH} = 7,1$) en fonction de la température. Les points correspondent aux valeurs expérimentales et les lignes aux ajustements mathématiques des données expérimentales.

L'entropie d'activation ΔS^\ddagger permet d'avoir une information sur le mécanisme d'échange des molécules d'eau. Lorsque cette dernière est positive, le mécanisme tend vers un mécanisme dissociatif où le départ de la molécule d'eau liée au métal se fait avant l'arrivée d'une autre molécule d'eau. Inversement, lorsque l'entropie d'activation est négative, le mécanisme tend vers un mécanisme associatif et le départ de la molécule d'eau liée au métal se fait après l'arrivée d'une autre molécule d'eau. Néanmoins, il faut noter que l'erreur est toujours assez importante sur la valeur d'entropie déterminée à partir des données de RMN de ^{17}O . Les valeurs des entropies d'activation ΔS^\ddagger des trois complexes sont négatives ($-62(3) \text{ kJ.mol}^{-1}$, $-49(12) \text{ kJ.mol}^{-1}$ et $-60(6) \text{ kJ.mol}^{-1}$) pour MnL_1 , MnL_2 et MnL_4 respectivement (Tableau 3.4), le mécanisme d'échange est donc plutôt associatif. C'est ce qui est généralement attendu avec des complexes de Mn^{2+} hexacoordinés où le mode d'activation du mécanisme d'échange passe par un état de transition au nombre de coordination (NC) de sept (commun pour les complexes de Mn^{2+}) tandis qu'un mécanisme dissociatif impliquerait un état de transition avec un NC de 5, ce qui est moins probable.¹³

Enfin, la relaxivité du complexe MnL_1 a également été étudiée dans l'albumine humaine sérique (HSA) et des relaxivités plus élevées ont été observées (Figure 3.21). A 20 MHz, la relaxivité passe de $4,28 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ dans l'eau à $6,46 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ dans HSA à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ et de $3,36 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à $5,12 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Cette augmentation traduit une interaction favorable avec la HSA qui permet de former des adduits supramoléculaires plus relaxants du fait du τ_{RH} supérieur. De plus, cette interaction n'empêche pas la coordination d'une molécule d'eau en sphère interne et sa vitesse d'échange reste rapide (non limitante). Toutefois, cette augmentation de relaxivité reste faible par rapport à ce qui avait déjà été observée avec des ligands où des fonctions hydrophobes avaient été ajoutées pour promouvoir des interactions avec la HSA (voir Chapitre I, Figure 1.22, 1.32 et 1.35).¹⁴⁻¹⁷ Le même type d'optimisation pourra être réalisé avec MnL_1 par une fonctionnalisation de l'amine primaire.

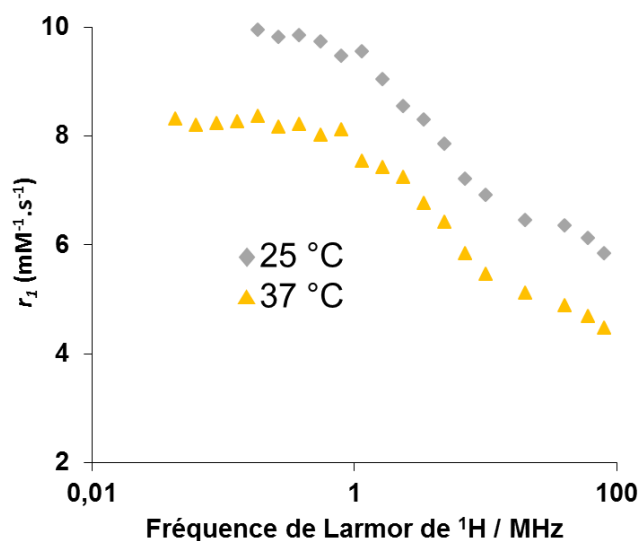


Figure 3.21 : Profil NMRD du complexe MnL_1 ($c_{MnL_1} = 1,2 \text{ mM}$, $\text{pH } 7$) à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ et $37 \text{ }^\circ\text{C}$ dans l'albumine sérique humaine.

3.2. Etudes des complexes avec des bispidines possédant un bras dérivé du méthylèncarboxylate.

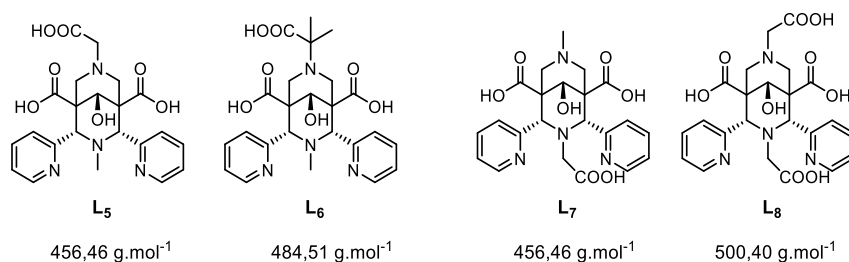


Figure 3.22 : Structures des ligands discutés dans cette partie avec leurs poids moléculaires.

Les complexes MnL_5 , MnL_6 , MnL_7 et MnL_8 ont des relaxivités de $3,66 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $3,71 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $2,59 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $2,79 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ respectivement (Figure 3.23, 60 MHz, 25 °C). Les complexes MnL_7 et MnL_8 ont des relaxivités beaucoup plus faibles que les complexes de cette série alors que MnL_7 présente le même poids moléculaire que MnL_5 et que MnL_8 a un poids moléculaire plus important (Figure 3.22). Cette différence laisse penser que les deux complexes présentent moins d'une molécule d'eau dans leur sphère de coordination. Cette hypothèse est vérifiable pour MnL_7 où un nombre d'hydratation q de 0,5 a été estimé avec l'équation 3.9, à partir des données de vitesses de relaxation transversale de l' ^{17}O . Ce résultat est inattendu lorsque l'on considère le nombre de coordination du ligand L_7 dans une conformation chaise-chaise (NC = 5). Pour MnL_8 , le maximum de la relaxivité transversale en fonction de la température n'est pas atteint dans la gamme de température accessible, q ne peut donc pas être estimé. Cependant, les valeurs de relaxivité transversales de ^{17}O sont très faibles (la plus haute valeur de r_2^0 est de $142,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) et la courbe décrit une allure différente de celle observée pour les autres complexes (Figure 3.24), ce qui suggère aussi que le complexe présente moins d'une molécule d'eau dans la première sphère de coordination du métal. Ces deux complexes présentent donc probablement un mélange d'espèces hydratées et non hydratées et il est difficile de réaliser un ajustement correct de ces données expérimentales car on ne peut pas savoir la proportion des différentes espèces à chaque température. C'est pourquoi, seuls les complexes MnL_5 et MnL_6 ont fait l'objet d'ajustements mathématiques. Les paramètres utilisés pour ces fits sont présentés dans le Tableau 3.5.

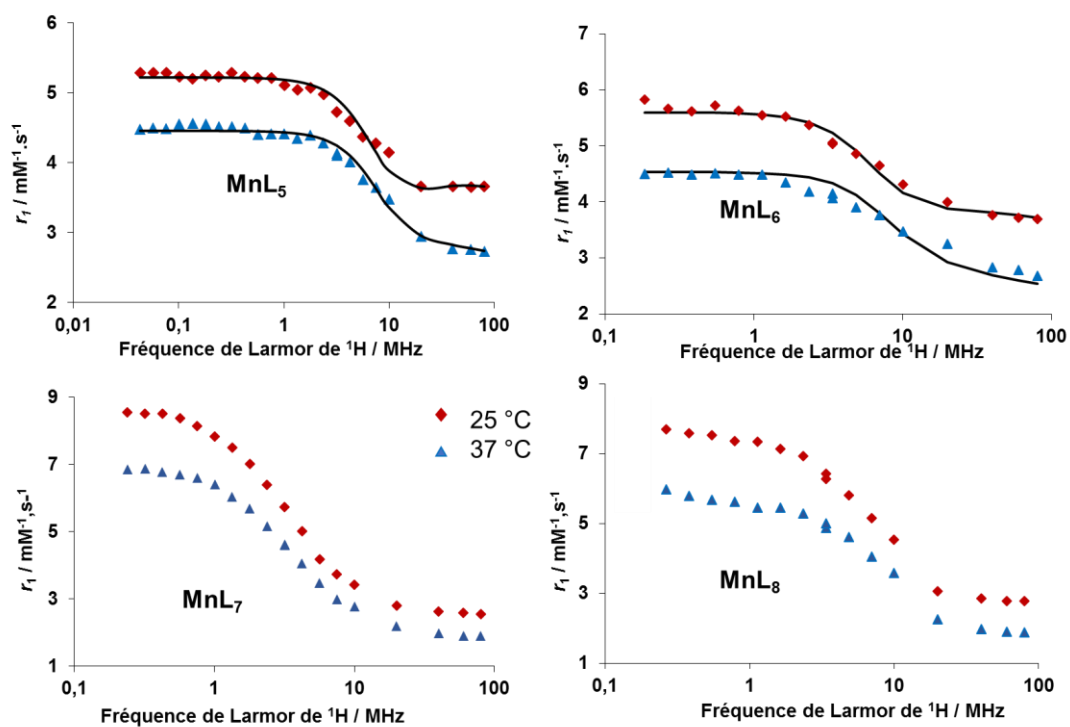


Figure 3.23 : Profils NMRD des complexes MnL_5 ($c_{MnL_5} = 1,4 \text{ mM}$), MnL_6 ($c_{MnL_6} = 1,2 \text{ mM}$), MnL_7 ($c_{MnL_7} = 1,3 \text{ mM}$) et MnL_8 ($c_{MnL_8} = 1,2 \text{ mM}$) à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ et $37 \text{ }^\circ\text{C}$ dans l'eau ($\text{pH } 7,4$). Les points correspondent aux valeurs expérimentales et les lignes aux ajustements mathématiques des données expérimentales.

Complexes	MnL_5	MnL_6	MnL_7	MnL_8
$r_1(\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}), 60 \text{ MHz}, 25^\circ\text{C}$	3,66	3,71	2,59	2,79
$k_{\text{ex}}^{298} (10^7 \text{ s}^{-1})$	5,5(1)	6,6(2)	-	-
$\Delta H^\ddagger (\text{kJ}.\text{mol}^{-1})$	14,9 (4)	11,9(8)	-	-
$\Delta S^\ddagger (\text{kJ}.\text{mol}^{-1})$	-96,7	-56	-	-
$E_{\text{rH}} (\text{kJ}.\text{mol}^{-1})$	20(1)	29(2)	-	-
$\tau_{\text{rH}}^{298} (\text{ps})$	89(2)	93(3)	-	-
$\tau_{\text{v}}^{298} (\text{ps})$	17(1)	20(1)	-	-
$\Delta^2 (10^{-19} \text{ s}^{-2})$	1,64(9)	1,2(1)	-	-
$A_0/\hbar (10^6 \text{ rad}.\text{s}^{-2})$	33,2(2)	28,0(2)	-	-

Tableau 3.5 : Relaxivités et paramètres caractérisant l'échange d'eau, la rotation et la relaxation électronique des complexes MnL_5 et MnL_6 obtenus par les ajustements mathématiques des données expérimentales des profils NMRD (à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ et $37 \text{ }^\circ\text{C}$) et de la relaxation transversale réduite d' ^{17}O (400 MHz).

Pour MnL_5 , un nombre d'hydratation q de 1 ($r_{2max}^o = 435 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) a pu être estimé avec l'équation 3.9. Pour MnL_6 , bien que le maximum ne soit pas encore atteint, le plus haut point obtenu donne un nombre d'hydratation de 0,7 ce qui signifie que le r_{2max}^o donnera probablement une valeur de q proche de 1. Leurs relaxivités, ainsi que leurs temps de corrélation rotationnelle sont pratiquement identiques (Tableau 3.5). Comme pour les trois complexes précédents, le profil NMRD (Figure 3.23) montre une diminution de la relaxivité lorsque la température augmente signifiant que c'est le temps de corrélation rotationnelle qui limite la relaxivité.

Les vitesses d'échange des molécules d'eau k_{ex} des deux complexes sont également proches ($5,5 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ et $6,6 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ pour MnL_5 et MnL_6 respectivement). Les entropies d'activation des deux complexes sont négatives ce qui suggère un mécanisme d'échange associatif dans les deux cas (Tableau 3.5).

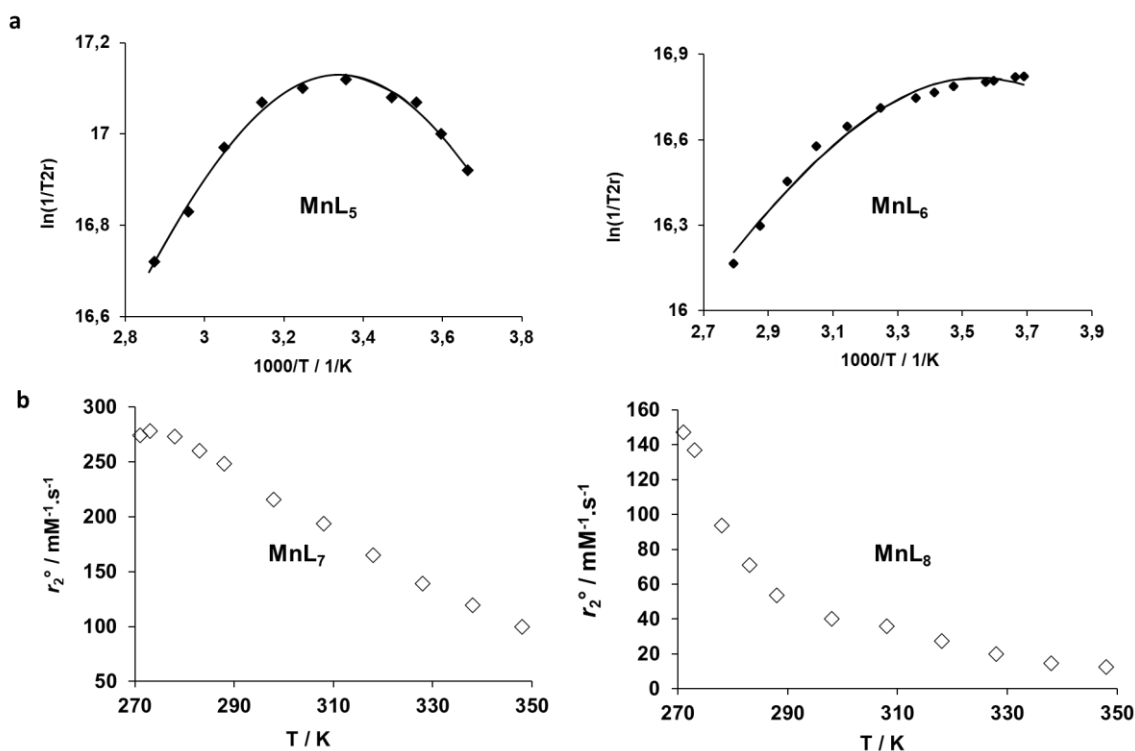
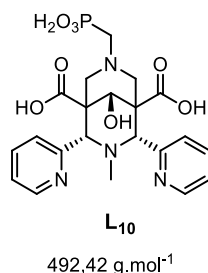


Figure 3.24 : a) Vitesses de relaxation transversale réduites de ^{17}O (400 MHz) de MnL_5 ($c_{\text{MnL}_5} = 4,2 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$) et MnL_6 ($c_{\text{MnL}_6} = 3,5 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$, $\text{pH} = 7,0$) en fonction de la température. b) Relaxivités transversales de ^{17}O de MnL_7 ($c_{\text{MnL}_7} = 4,1 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$) et MnL_8 ($c_{\text{MnL}_8} = 4,8 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$, $\text{pH} = 7,2$) en fonction de la température. Les points correspondent aux valeurs expérimentales et les lignes aux ajustements mathématiques des données expérimentales.

3.3. Etude du complexe MnL_{10} avec une bispidine phosphonatée.Figure 3.25 : Structure du ligand L_{10} avec son poids moléculaire.

Le profil NMRD du complexe MnL_{10} (Figure 3.25) a une allure similaire aux précédents complexes (Figure 3.26 a). La relaxivité du complexe est de $3,91 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Figure 3.26 a , 60 MHz, 25 °C). Elle est un peu plus élevée que celle de son analogue carboxylate, ce qui peut être la conséquence d'une contribution de la deuxième sphère de coordination à la relaxivité. Toutefois, il faut noter que cette augmentation reste minime en comparaison à celle qui avait été observée avec les dérivés du NOTA où la relaxivité de l'analogue phosphonaté $Mn\text{-}9\text{ane-N}_2\text{O-}2\text{P}$ ($r_1 = 5,08 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 20 MHz, 25 °C) est quasiment le double de celle de son analogue carboxylate $9\text{ane-N}_2\text{O-}2\text{A}$ ($r_1 = 2,83 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 20 MHz, 25 °C).¹⁸

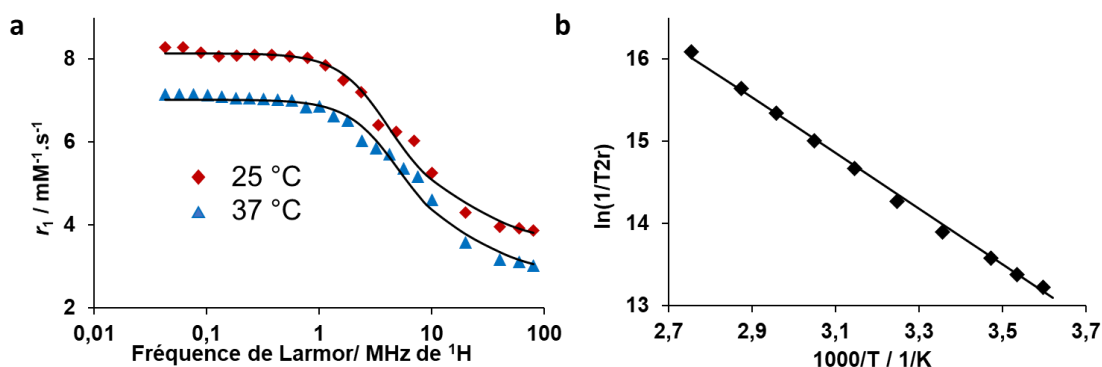


Figure 3.26: a) Profil NMRD du complexe MnL_{10} ($c_{MnL_{10}} = 1,8 \text{ mM}$, $pH 7$) à 25 °C et 37 °C dans l'eau ($pH 7$) b) Vitesses de relaxation transversale réduite de ^{17}O (400 MHz) de MnL_{10} ($c_{MnL_{10}} = 4,6 \text{ mmol.kg}^{-1}$, $pH = 7,4$) en fonction de la température. Les points correspondent aux valeurs expérimentales et les lignes aux ajustements mathématiques des données expérimentales.

La vitesse de relaxation transversale $1/T_{2r}$ de ^{17}O augmente avec la température (Figure 3.26 b). Ceci correspond à un régime d'échange lent. Cette observation est confirmée avec l'ajustement mathématique des données expérimentales où une vitesse d'échange k_{ex} de $0,12 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ a été obtenue (Tableau 3.6). Elle est 50 fois plus faible que celle de MnL_5 ($k_{ex} = 5,5 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$). Le phosphonate est plus encombrant et plus chargé que le groupement carboxylate. De ce fait, sa taille et les interactions qu'il génère ralentissent l'échange de la molécule d'eau.^{6,18} L'entropie d'activation ΔS^\ddagger est négative ce qui indique un mécanisme d'échange associatif (Tableau 3.6).

Complexe	MnL_{10}
$r_1(\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}), 60 \text{ MHz}, 25^\circ\text{C}$	3,91
$k_{ex}^{298} (10^7 \text{ s}^{-1})$	0,12(1)
$\Delta H^\ddagger (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	25,71(7)
$\Delta S^\ddagger (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	-42(12)
$E_{rH} (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	19(1)
$\tau_{rH}^{298} (\text{ps})$	92(2)
$\tau_v^{298} (\text{ps})$	22(1)
$\Delta^2 (10^{-19} \text{ s}^{-2})$	0,35(1)
$A_O/\hbar (10^6 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-2})$	30(2)

Tableau 3.6 : Relaxivité et paramètres caractérisant l'échange d'eau, la rotation et la relaxation électronique du complexe MnL_{10} obtenus à partir des ajustements mathématiques simultanés des données expérimentales des profils NMRD (à 25°C et 37°C) et de la relaxation transversale réduite de ^{17}O (400 MHz).

4. Conclusion et comparaison des différents systèmes.

La stabilité thermodynamique, l'inertie cinétique et la relaxivité des complexes ont été étudiées. Les études potentiométriques ont permis d'établir les constantes de protonation des ligands et les constantes de stabilité thermodynamique des complexes. Ces dernières donnent un premier indice sur les fonctions qui sont impliquées dans la coordination du métal à pH physiologique. Pour les complexes MnL_1 , MnL_4 , MnL_5 , MnL_6 et MnL_{10} , la conformation chaise-chaise avec une coordination des amines tertiaires, de la fonction carboxylate ou phosphonate et d'une molécule d'eau ne fait pas de doute. Pour MnL_7 et MnL_8 (contenant une fonction COOH en N3) ce résultat est moins évident car une des deux amines tertiaires de la molécule ne participe pas à la coordination du métal alors que MnL_8 présente la constante de stabilité la plus élevée et MnL_7 a une constante de stabilité similaire aux autres complexes. De plus, ces deux complexes sont 1000 fois moins inertes que les autres et leurs relaxivités sont aussi beaucoup plus faibles du fait de la présence de moins d'une molécule d'eau dans la première sphère de coordination du métal. La présence du bras méthylèncarboxylate en position N3 de la bispidine désavantage donc l'inertie cinétique et la relaxivité. Une première hypothèse qui pourrait justifier ce résultat serait que pour MnL_7 et MnL_8 , la bispidine n'adopte pas la conformation chaise-chaise attendue mais une conformation intermédiaire entre une conformation chaise-chaise et bateau-chaise. Pour vérifier cette hypothèse, des études cristallographiques de ces complexes devront être réalisées.

Par rapport à MnL_1 , le remplacement de la fonction amide (MnL_3), la réduction des alcools (MnL_2) et le retrait de la chaîne lysine (MnL_5) ont eu pour conséquence de diminuer l'inertie cinétique et la relaxivité. Il semble donc qu'un ensemble d'interactions impliquant l'amine primaire de la lysine et les groupements carboxylates présents sur le squelette bispidine favorise l'inertie cinétique et la relaxivité. Le remplacement de la fonction carboxylate par la fonction phosphonate a aussi entraîné la diminution de l'inertie cinétique et de la relaxivité.

Le complexe MnL_1 se distingue donc par une haute relaxivité et une inertie cinétique exceptionnelle qui n'a jamais été observée jusqu'à présent pour un complexe de Mn^{2+} monohydraté. Par conséquent, ce complexe a été utilisé pour des applications *in vivo* en IRM et pour le radiomarquage au ^{52}Mn dont les résultats seront présentés dans le prochain chapitre.

5. Références

- (1) 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*; Merbach, A., Helm, L., Tóth, É., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2013; pp 157–208. <https://doi.org/10.1002/9781118503652.ch4>.
- (2) Gillet, R.; Roux, A.; Brandel, J.; Huclier-Markai, S.; Camerel, F.; Jeannin, O.; Nonat, A. M.; Charbonnière, L. J. A Bispidol Chelator with a Phosphonate Pendant Arm: Synthesis, Cu(II) Complexation, and ^{64}Cu Labeling. *Inorg. Chem.* **2017**, *56* (19), 11738–11752. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b01731>.
- (3) Roux, A.; Nonat, A. M.; Brandel, J.; Hubscher-Bruder, V.; Charbonnière, L. J. Kinetically Inert Bispidol-Based Cu(II) Chelate for Potential Application to $^{64/67}\text{Cu}$ Nuclear Medicine and Diagnosis. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (9), 4431–4444. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b00207>.
- (4) Gale, E. M.; Atanasova, I. P.; Blasi, F.; Ay, I.; Caravan, P. A Manganese Alternative to Gadolinium for MRI Contrast. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (49), 15548–15557. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b10748>.
- (5) Botár, R.; Molnár, E.; Trencsényi, G.; Kiss, J.; Kálmán, F. K.; Tircsó, G. Stable and Inert Mn(II)-Based and PH-Responsive Contrast Agents. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (4), 1662–1666. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b09407>.
- (6) Drahoš, B.; Kotek, J.; Císařová, I.; Hermann, P.; Helm, L.; Lukeš, I.; Tóth, É. Mn $^{2+}$ Complexes with 12-Membered Pyridine Based Macrocycles Bearing Carboxylate or Phosphonate Pendant Arm: Crystallographic, Thermodynamic, Kinetic, Redox, and $^1\text{H}/^{17}\text{O}$ Relaxation Studies. *Inorg. Chem.* **2011**, *50* (24), 12785–12801. <https://doi.org/10.1021/ic201935r>.
- (7) Forgács, A.; Tei, L.; Baranyai, Z.; Tóth, I.; Zékány, L.; Botta, M. A Bisamide Derivative of [Mn(1,4-DO2A)] - Solution Thermodynamic, Kinetic, and NMR Relaxometric Studies. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2016**, *2016* (8), 1165–1174. <https://doi.org/10.1002/ejic.201501415>.
- (8) Kálmán, F. K.; Tircsó, G. Kinetic Inertness of the Mn $^{2+}$ Complexes Formed with AAZTA and Some Open-Chain EDTA Derivatives. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (19), 10065–10067. <https://doi.org/10.1021/ic300832e>.
- (9) Wahsner, J.; Gale, E. M.; Rodríguez-Rodríguez, A.; Caravan, P. Chemistry of MRI Contrast Agents: Current Challenges and New Frontiers. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (2), 957–1057. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00363>.
- (10) Botta, M.; Carniato, F.; Esteban-Gómez, D.; Platas-Iglesias, C.; Tei, L. Mn(II) Compounds as an Alternative to Gd-Based MRI Probes. *Future Medicinal Chemistry* **2019**, *11* (12), 1461–1483. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0608>.
- (11) Rolla, G. A.; Platas-Iglesias, C.; Botta, M.; Tei, L.; Helm, L. ^1H and ^{17}O NMR Relaxometric and Computational Study on Macrocyclic Mn(II) Complexes. *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (6), 3268–3279. <https://doi.org/10.1021/ic302785m>.
- (12) Gale, E. M.; Zhu, J.; Caravan, P. Direct Measurement of the Mn(II) Hydration State in Metal Complexes and Metalloproteins through ^{17}O NMR Line Widths. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (49), 18600–18608. <https://doi.org/10.1021/ja4094132>.

- (13) Balogh, E.; He, Z.; Hsieh, W.; Liu, S.; Tóth, É. Dinuclear Complexes Formed with the Triazacyclononane Derivative ENOTA⁴⁻ : High-Pressure ¹⁷O NMR Evidence of an Associative Water Exchange on [Mn^{II}₂(ENOTA)(H₂O)₂]. *Inorg. Chem.* **2007**, *46* (1), 238–250. <https://doi.org/10.1021/ic0616582>.
- (14) Forgács, A.; Tei, L.; Baranyai, Z.; Esteban-Gómez, D.; Platas-Iglesias, C.; Botta, M. Optimising the Relaxivities of Mn²⁺ Complexes by Targeting Human Serum Albumin (HSA). *Dalton Trans.* **2017**, *46* (26), 8494–8504. <https://doi.org/10.1039/C7DT01508A>.
- (15) Kálmán, F. K.; Nagy, V.; Váradi, B.; Garda, Z.; Molnár, E.; Trencsényi, G.; Kiss, J.; Mème, S.; Mème, W.; Tóth, É.; Tircsó, G. Mn(II)-Based MRI Contrast Agent Candidate for Vascular Imaging. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (11), 6057–6065. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00197>.
- (16) Aime, S.; Anelli, P.; Botta, M.; Brocchetta, M.; Canton, S.; Fedeli, F.; Gianolio, E.; Terreno, E. Relaxometric Evaluation of Novel Manganese(II) Complexes for Application as Contrast Agents in Magnetic Resonance Imaging. *J Biol Inorg Chem* **2002**, *7* (1–2), 58–67. <https://doi.org/10.1007/s007750100265>.
- (17) Troughton, J. S.; Greenfield, M. T.; Greenwood, J. M.; Dumas, S.; Wiethoff, A. J.; Wang, J.; Spiller, M.; McMurry, T. J.; Caravan, P. Synthesis and Evaluation of a High Relaxivity Manganese(II)-Based MRI Contrast Agent. *Inorg. Chem.* **2004**, *43* (20), 6313–6323. <https://doi.org/10.1021/ic049559g>.
- (18) Drahoš, B.; Pniok, M.; Havlíčková, J.; Kotek, J.; Císařová, I.; Hermann, P.; Lukeš, I.; Tóth, É. Mn²⁺ Complexes of 1-Oxa-4,7-Diazacyclononane Based Ligands with Acetic, Phosphonic and Phosphinic Acid Pendant Arms: Stability and Relaxation Studies. *Dalton Trans.* **2011**, *40* (39), 10131. <https://doi.org/10.1039/c1dt10543d>.

CHAPITRE IV

Fonctionnalisation et application en IRM et en TEP

Ce chapitre va présenter les applications réalisées en IRM et en TEP avec MnL_1 . Pour la TEP, il est nécessaire que ce complexe soit vectorisé et pour cela des étapes de fonctionnalisation sont nécessaires. C'est pourquoi la première partie de ce chapitre abordera les différentes fonctionnalisations réalisées avec le ligand L_1 . Dans un second temps, une étude de radiomarquage du ligand L_1 avec le manganèse 52 et une étude TEP *in vivo* sur des souris porteuses de tumeurs colorectales seront présentées. La dernière partie concernera enfin une étude IRM *in vivo* sur des souris saines.

1. Fonctionnalisation.

Le ligand L_1 a été fonctionnalisé avec une fonction isothiocyanate. L'avantage de cette fonction est qu'elle réagit rapidement avec les amines primaires telles que celles présentes sur les chaînes latérales des lysines.

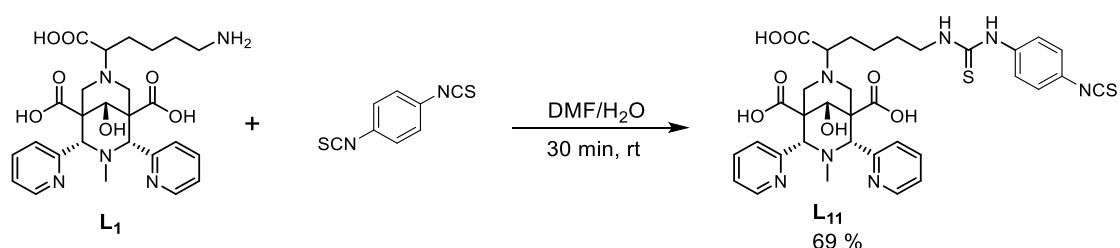


Figure 4.1 : Synthèse du ligand L_{11} .

La réaction est réalisée entre l'amine primaire de la lysine et le 1,4-phénylène diisocyanate (PDITC) dans le DMF avec 10 % d'eau pour permettre la solubilisation (Figure 4.1). Un excès de PDITC est ajouté pour éviter une réaction entre le ligand L_1 et le ligand L_{11} dans le milieu réactionnel. Aucune base n'est ajoutée car le ligand L_1 a été obtenu à la suite d'une hydrolyse avec NaOH et son pH était donc basique. Le ligand L_{11} est isolé sous la forme $C_{34}H_{37}N_7O_7S_2 \cdot 3NaOH \cdot H_2O$ (77 mg) avec un rendement 69 %. Il a été caractérisé par LC-MS et par RMN. Sur le spectre RMN ¹H, l'ajout de la fonction est visible dans la région des aromatiques (7.23 ppm – 7.88 ppm) avec la présence de signaux qui intègrent pour 4 protons (Figure 4.2).

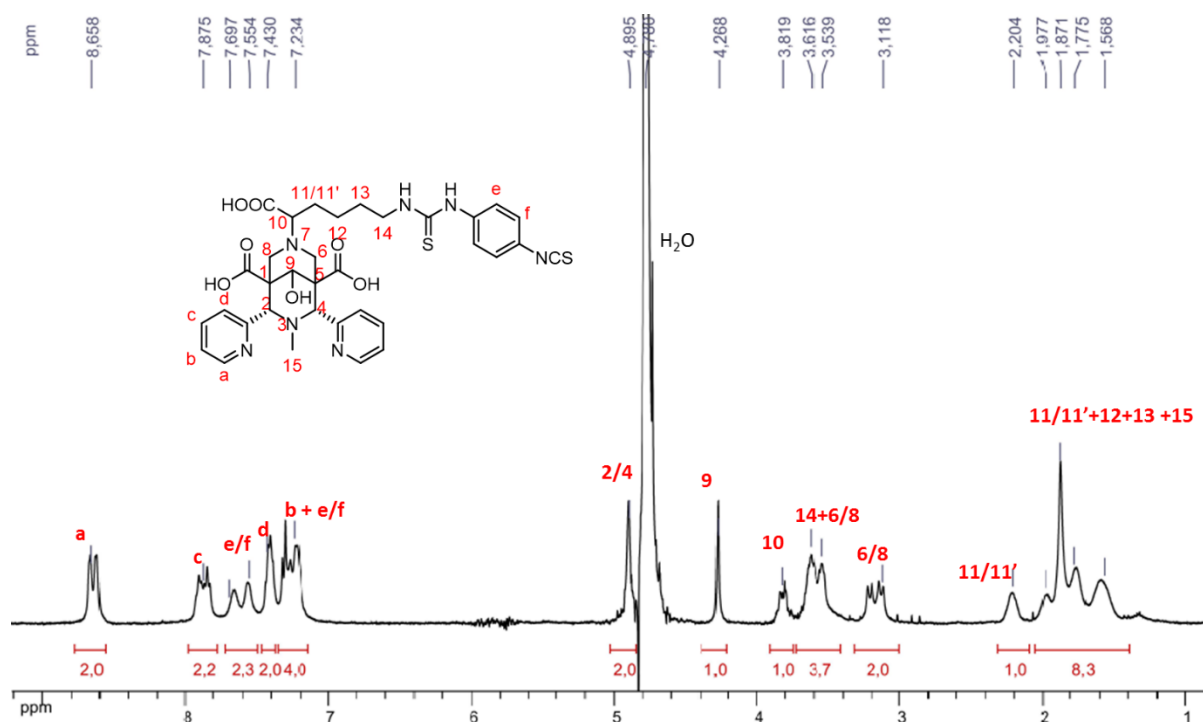


Figure 4.2 : Spectre RMN ^1H du ligand L_{11} (400 MHz, D_2O , 25 °C).

Le ligand L_1 a aussi été fonctionnalisé avec une chaîne C_{12} dans le but de greffer le ligand à des nanoparticules lipidiques. L'objectif serait d'obtenir des nanoparticules à base de complexes de $\text{Mn}(\text{II})$ pour des applications en imagerie moléculaire par IRM.¹

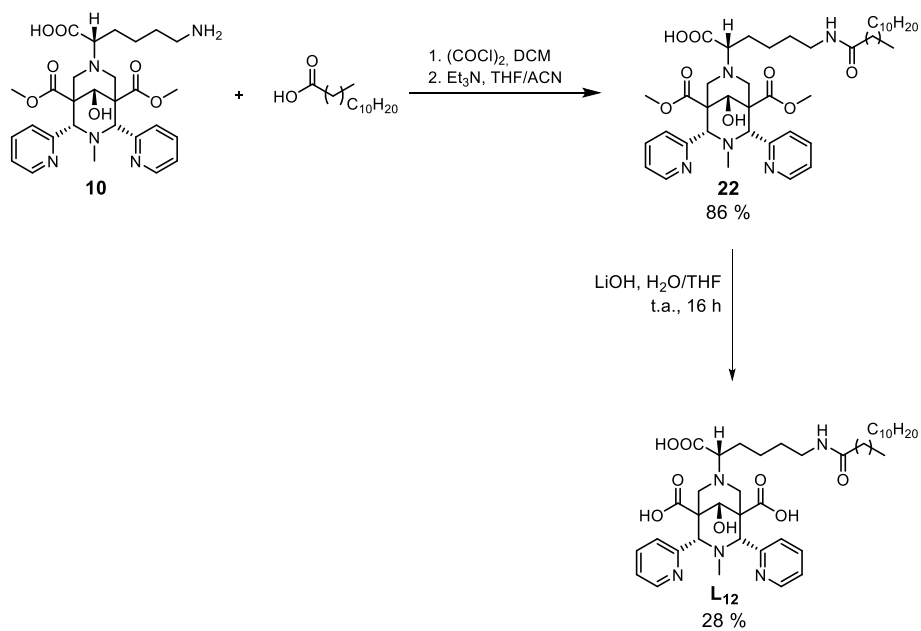


Figure 4.3 : Synthèse du ligand L_{12} .

La première étape de cette synthèse est la formation du chlorure d'acide après une réaction entre l'acide dodécanoïque et le chlorure d'oxalyle dans le DCM (Figure 4.3). Une fois le chlorure d'acide formé, le solvant et le chlorure d'oxalyle en excès sont évaporés par distillation sous vide. Le ligand **L**₁ est ensuite ajouté au milieu réactionnel, pour réagir dans une réaction d'addition-élimination en présence de triéthylamine. A la fin de la réaction, le produit a été purifié par FPLC sur phase normal (SiO₂, DCM/MeOH) mais le spectre RMN ¹H a montré la présence de signaux correspondant à des sels de triéthylamine. C'est pourquoi une seconde purification par FPLC sur phase inverse (C₁₈, H₂O/ACN) a été réalisée. Le composé **22** a été obtenu avec un rendement de 86 % (69 mg). Le ligand **L**₁₂ est ensuite obtenu après hydrolyse des esters méthyliques sous la forme C₃₈H₅₅N₅O₉ avec un rendement de 28 %. Une quantité importante de produit a été perdue lors de l'étape de purification. Elle pourra donc être optimisée. Sur le spectre RMN ¹H (Figure 4.4), l'ajout de la chaîne grasse est visible à 1,27 ppm où un signal large intégrant pour 16 protons est présent. Elle est aussi visible par la présence d'un triplet intégrant pour 3 protons à 0,88 ppm qui correspond au méthyl du bout de la chaîne. La relaxivité du complexe MnL₁₂ a été mesurée et elle est de 4,89 mM⁻¹s⁻¹ (60 MHz, 25 °C). Un gain de 18 % de la relaxivité a été obtenu par rapport à MnL₁ probablement en grande partie du fait de l'augmentation du poids moléculaire du ligand.

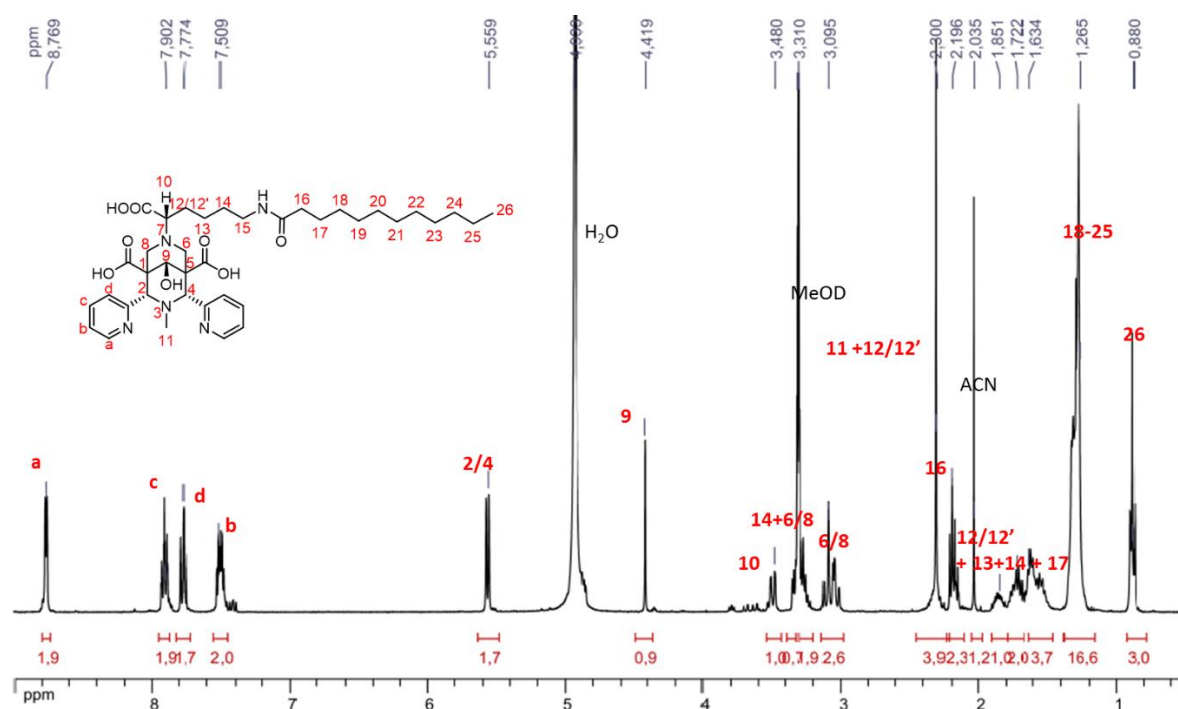


Figure 4.4 : Spectre RMN ¹H du ligand **L**₁₂ (400 MHz, MeOD, 25 °C).

Une dernière fonctionnalisation du ligand **L1** a été réalisée dans le but d'ajouter le peptide RGD cyclique. Ce peptide cible les intégrines, des protéines qui sont surexprimées dans une série de tumeurs de cellules membranaires.² La première étape de synthèse du bioconjugué est la fonctionnalisation de **L1** avec une fonction maléimide d'après un protocole décrit par Roux et al.³ (Figure 4.5). Le ligand **L1** réagit avec l'ester activé **23** dans une réaction de couplage peptidique en présence de N-méthylmorpholine dans le DMF. L'étape de conjugaison a été réalisée au CBM en collaboration avec Jean-Baptiste Madinier et le Dr Vincent Aucagne. Elle est réalisée dans le PBS (« Phosphate Buffer Saline ») à pH 7 pendant 5 min à température ambiante. Le mélange a ensuite été purifié par HPLC et caractérisé par LC-MS. Ce ligand a par la suite été radiomarqué au ⁵²Mn pour des études *in vivo* qui seront présentées dans une prochaine partie.

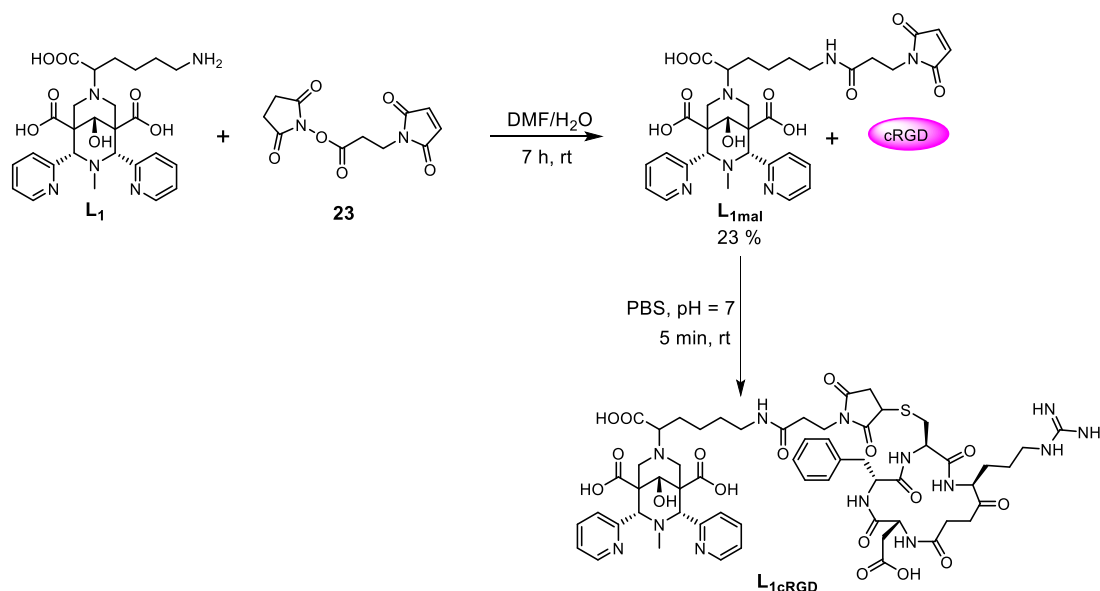


Figure 4.5 : Synthèse du ligand bioconjugué **L1cRGD**.

2. Radiomarquage de **L1** au manganèse 52 et étude *in vivo* en TEP.

Le manganèse 52 a été produit pour la première fois en France au cyclotron du CEHMTI (CNRS, Orleans) par le Dr Isidro Da Silva.⁴ Il a été obtenu par bombardement d'un faisceau de proton sur une cible de chrome 52 d'après la réaction nucléaire $^{52}\text{Cr}(p,n)^{52}\text{Mn}$. Le radiomarquage du ligand **L1** a ensuite été réalisé avec la collaboration du Dr Sara Lacerda et de Daouda Ndiaye du CBM. Les meilleures conditions de radiomarquage étaient à pH 7, à 70 °C

pendant 1 h avec un ratio Mn : L de 1 : 10⁴. Un rendement de radiomarquage de 99 % a alors été obtenu.

La stabilité du radiocomplexe a ensuite été évaluée dans l'eau, la HSA, le PBS et la saumure. Les études ont montré qu'après 18 h seul 3 % de ⁵²Mn étaient libérés mais qu'après 24h, la stabilité était plus modérée avec environ 80 % du radiocomplexe dans les différents milieux (Figure 4.6).

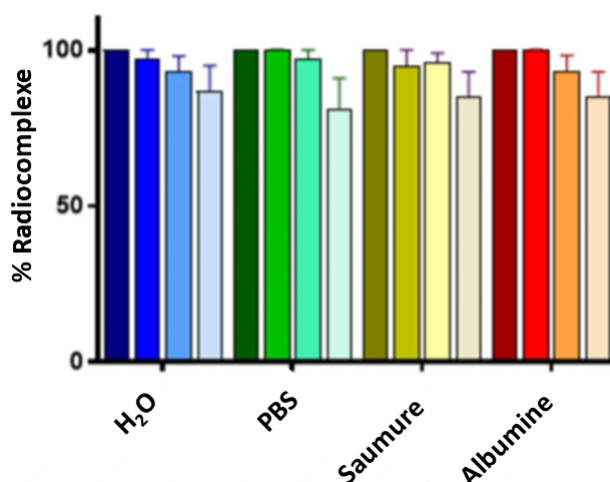


Figure 4.6 : Stabilité *in vitro* de ⁵²MnL dans l'eau, le PBS, la saumure, l'albumine à 0 h, 1 h, 18 h et 24 h (de la couleur la plus foncée à la plus claire, respectivement).

Au vue de ces résultats le ligand **L1RGD** a été radiomarqué au ⁵²Mn (pH 7,3 h, rendement de radiomarquage (RR) = 98 %) et une étude de biodistribution sur trois souris porteuses de tumeurs colorectales a été réalisée. L'étude a été menée au CIPA (Centre d'imagerie du petit animal, Orléans) avec la collaboration du Dr Stéphanie Lerondel et de Julien Sobilo. Pour cela, 4 h après l'injection du radiocomplexe les tumeurs et les principaux organes ont été prélevés, pesés et leur activité a été mesurée. La figure 4.7 présente le pourcentage de dose injectée par gramme d'organe. Le point important de cette étude se situe au niveau du ratio tumeur/intestin car les cellules tumorales ont été injectées au niveau de la paroi intestinale. Ici, ce ratio est de 6 : 2 (tumeur : intestin), ce qui signifie que l'activité est bien localisée dans la tumeur et que la vectorisation est efficace. Ce résultat préliminaire est très prometteur mais des études supplémentaires devront être réalisées afin de comprendre pourquoi une accumulation dans les poumons et les muscles est observée mais aussi afin d'obtenir une première image TEP avec ce radiocomplexe.

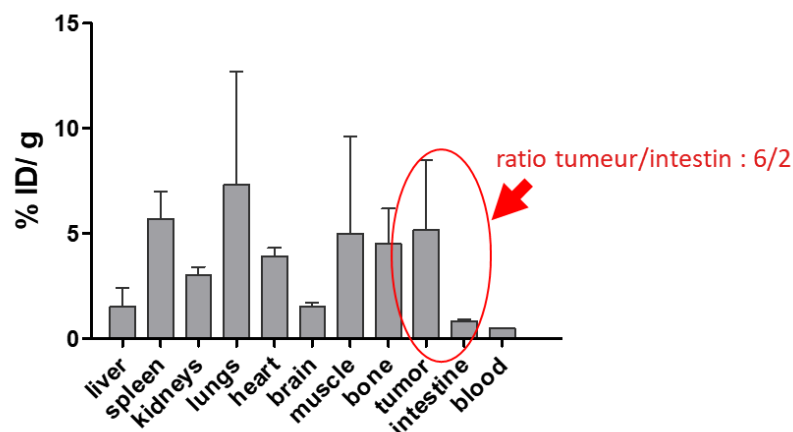


Figure 4.7: Biodistribution de $^{52}\text{MnL1RGD}$ 4 h après l'injection de $^{52}\text{MnL1RGD}$ (2 MBq).

3. Etude IRM *in vivo* avec le complexe MnL1 .

Afin de valider le potentiel du complexe MnL1 comme agent de contraste pour l'IRM, une étude *in vivo* a été menée sur des souris saines. L'étude a été réalisée au CBM avec la collaboration du Dr Sandra Mème et d'Agnès Pallier. Dans un premier temps, $0,06 \text{ mmol.kg}^{-1}$ du complexe MnL1 ont été injectés dans trois souris saines et des images pondérées en T_1 ont été acquises (Figure 4.8). L'intensité du signal a été suivie pendant 1 h (Figure 4.9). Le maximum d'intensité a été atteint au bout de 4 min. L'élimination du complexe se fait par voie rénale et on observe peu d'accumulation dans le foie. Un temps de demi-vie de 21 min a été estimé et il est similaire à ce qui avait déjà été observé sur des molécules de petites tailles.^{5,6}

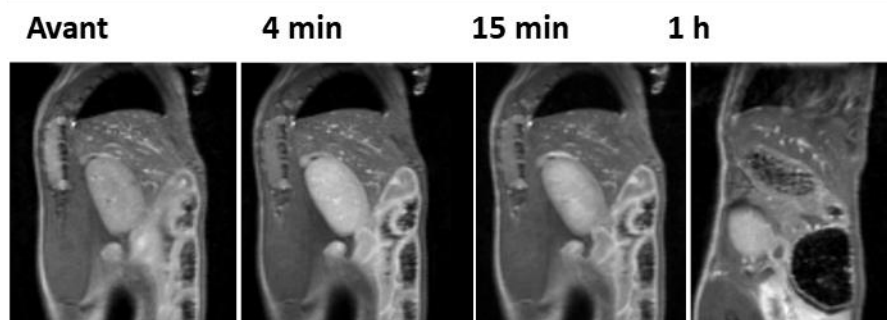


Figure 4.8 : Image pondérée en T_1 en coupe sagittale d'une souris, avant, 4 min, 15 min et 1 h après injection de $0,06 \text{ mmol.kg}^{-1}$ de MnL1 .

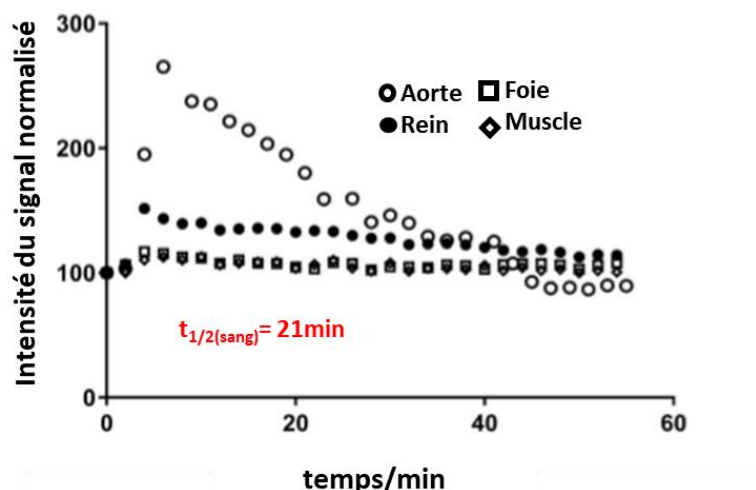


Figure 4.9 : Intensité du signal normalisé dans les reins, le muscle et le foie en fonction du temps. Les mesures ont été réalisées toutes les 2 minutes chez 4 souris.

La biodistribution du complexe a ensuite été vérifiée *ex vivo* 1,5 h post injection par ICP-OES en comparant la quantité de Mn présente dans les souris ayant reçu le complexe MnL₁ à celle de souris contrôles (Figure 4.10). La majorité du manganèse est retrouvée dans le rein mais aussi dans le sang. Ceci est probablement dû à des faibles interactions avec des protéines sanguines telles que cela avait été observé avec les études relaxométriques (Chapitre III, Figure 3.21). La quantité de manganèse restant dans le foie et les reins 1,5 h post injection est plus faible que celle qui avait été observée avec le Mn-PyC3A à 24 h post-injection.⁷

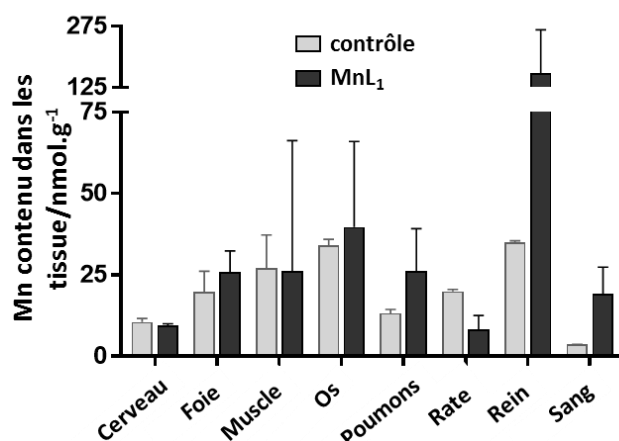


Figure 4.10 : Quantification *ex-vivo* par ICP-OES du Mn contenu dans le sang et les organes de souris ayant reçu MnL₁ (1.5 h post-injection) et de souris contrôle.

4. Références.

- (1) Kueny-Stotz, M.; Garofalo, A.; Felder-Flesch, D. Manganese-Enhanced MRI Contrast Agents: From Small Chelates to Nanosized Hybrids. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, 2012 (12), 1987–2005. <https://doi.org/10.1002/ejic.201101163>.
- (2) Jia, J.; Starodub, A.; Cushman, I.; Liu, Y.; Marshall, D. J.; Hurwitz, H. I.; Nixon, A. B. Dual Inhibition of AV Integrins and Src Kinase Activity as a Combination Therapy Strategy for Colorectal Cancer. *Anti-Cancer Drugs* **2013**, 24 (3), 237–250. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e32835d29fd>.
- (3) Roux, A.; Gillet, R.; Huclier-Markai, S.; Ehret-Sabatier, L.; Charbonnière, L. J.; Nonat, A. M. Bifunctional Bispidine Derivatives for Copper-64 Labelling and Positron Emission Tomography. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 15 (6), 1475–1483. <https://doi.org/10.1039/C6OB02712A>.
- (4) Vaudon, J.; Frealle, L.; Audiger, G.; Dutilly, E.; Gervais, M.; Sursin, E.; Ruggeri, C.; Duval, F.; Bouchetou, M.-L.; Bombard, A.; Da Silva, I. First Steps at the Cyclotron of Orléans in the Radiochemistry of Radiometals: ⁵²Mn and ¹⁶⁵Er. *Rev. Sci. Instrum.* **2018**, 2 (3), 15. <https://doi.org/10.3390/instruments2030015>.
- (5) La Cava, F.; Fringuello Mingo, A.; Miragoli, L.; Terreno, E.; Cappelletti, E.; Lattuada, L.; Poggi, L.; Colombo Serra, S. Synthesis, Characterization, and Biodistribution of a Dinuclear Gadolinium Complex with Improved Properties as a Blood Pool MRI Agent. *ChemMedChem* **2018**, 13 (8), 824–834. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201800052>.
- (6) Wang, J.; Wang, H.; Ramsay, I. A.; Erstad, D. J.; Fuchs, B. C.; Tanabe, K. K.; Caravan, P.; Gale, E. M. Manganese-Based Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging of Liver Tumors: Structure–Activity Relationships and Lead Candidate Evaluation. *J. Med. Chem.* **2018**, 61 (19), 8811–8824. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00964>.
- (7) Gale, E. M.; Atanasova, I. P.; Blasi, F.; Ay, I.; Caravan, P. A Manganese Alternative to Gadolinium for MRI Contrast. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137 (49), 15548–15557. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b10748>.

CHAPITRE V

Conclusion générale

Les travaux de cette thèse ont porté sur la synthèse de ligands de type bispidine pour la complexation du manganèse(II) et leur application en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et en Tomographie à Emission de Positron (TEP)

La synthèse de huit nouvelles bispidines a été présentée. Parmi elles, six bispidines sont pentadentates, une bispidine est hexadentate et une bispidine est octadentate. Deux voies de synthèse ont été utilisées. La première correspond à la synthèse classique des bispidines. Elle a permis de développer des ligands analogues au ligand L_1 et d'insérer l'acide aminé glutamate à la bispidine. La seconde est passée par la synthèse d'intermédiaires clefs qui permet l'ajout de différentes fonctions, sur différentes positions du squelette via des réactions de substitution nucléophile.

Les études de stabilité thermodynamique ont permis de déterminer les constantes de protonation des ligands ainsi que les constantes de protonation des complexes. Les stabilités thermodynamiques de ces complexes sont modérées. Les constantes de stabilité varient entre 11,26 et 14,40. Les complexes MnL_7 et MnL_8 se différencient des autres car une des amines tertiaires de ces complexes ne participe pas à la coordination des complexes. L'inertie cinétique des complexes a été étudiée par des réactions de décomplexation en présence de 50 équivalents de zinc(II). L'ensemble de la série se distingue de la majorité des complexes décrits dans la littérature du fait d'une inertie cinétique très élevée dans ces conditions. En particulier, le complexe MnL_1 s'est montré inerte pendant plus de 140 jours à pH 6 en présence de 50 équivalents de zinc(II). Les complexes MnL_7 et MnL_8 se démarquent ici encore, car ils sont 1000 fois moins inertes que les autres complexes de la série. Les études de relaxivités ont montré que ces complexes présentaient pour la plupart une molécule d'eau dans leur première sphère de coordination et qu'ils possédaient des relaxivités proches des complexes de gadolinium actuellement sur le marché. Seuls les complexes MnL_7 et MnL_8 ont moins d'une molécule d'eau dans leur sphère de coordination. Les études potentiométrique, cinétique et de relaxivité suggèrent donc que les complexes MnL_7 et MnL_8 n'ont pas la même cavité de coordination que les autres complexes présentés et que l'ajout du bras carboxylate en position N3 de la bispidine et plus particulièrement la protonation de l'amine qu'il entraîne, défavorise l'inertie cinétique et la relaxivité.

Le complexe MnL_1 a pu faire l'objet d'études de radiomarquage avec le manganèse 52 et un rendement de radiomarquage de 99 % a été obtenu. Une vectorisation a été réalisée avec le peptide RGD cyclique et des études *in vivo* sur des souris porteuses de tumeurs colorectales ont montré que l'activité était bien localisée au niveau de la tumeur. Le potentiel de MnL_1 comme agent de contraste à base de manganèse(II) pour l'IRM a été évalué *in vivo*. Les travaux ont montré que ce complexe était rapidement éliminé par voie rénale. Les ligands de type bispidine se présentent donc comme des nouveaux ligands de choix pour la complexation du manganèse à des fins d'application en imagerie médicale.

Ces travaux ouvrent plusieurs perspectives. D'abord des études cristallographiques devront être réalisées avec les complexes MnL_7 et MnL_8 afin d'identifier leurs structures. De nouvelles bispidines pourraient aussi être synthétisées afin d'y ajouter des groupements qui favoriseraient l'interaction avec l'albumine sérique humaine (HSA). Le développement de sondes redox pourrait aussi être envisagé par la synthèse de bispidine « Janus » qui contiendrait un groupement capable de stabiliser Mn^{2+} et un second groupement capable de stabiliser Mn^{3+} et dont la coordination avec l'un ou l'autre groupement dépendrait de l'état d'oxydation du manganèse. Enfin, la synthèse de complexes polynucléaires pour l'imagerie moléculaire par IRM serait aussi une possibilité. Pour le ligand octadentate L_9 , des études de radiomarquage au gallium 68 sont en cours et ce dernier pourra aussi être utilisé pour le radiomarquage au zirconium 89.

CHAPITRE VI

Partie Expérimentale

General Methods

Solvent and starting materials were purchased from Aldrich, Alfa Aesar and Fluorochem. They were used without further purification unless specified. Elemental analysis and mass spectroscopy were carried out by the “Plateforme d’Analyse Inorganique” of the REPSEM (Reconnaissance et Procédés de Séparation et Séparation Moléculaire) and by the “Service Commun d’Analyse” of the University of Strasbourg. Purifications were made on Spot II Flash Purification Liquid Chromatography (FPLC) from Interchim. Distilled water was purified by passing through a mixed bed of ion-exchanger (Bioblock Scientific R3-83002). The NMR spectra were recorded on a Bruker Avance III HD-400 MHz and a Bruker Avance III HD-500 MHz. Chemical shifts are reported in ppm, with residual protonated solvent as internal reference.¹ The multiplicity of signals are given for the ¹H NMR spectra (s: singlet, d: doublet, dd: doublet of doublet, t: triplet, q: quadruplet and m: multiplet). IR spectra were recorded on a Perkin Elmer Spectrum One Spectrophotometer as solid samples and only the most significant absorption bands are given in cm⁻¹.

Preparation of the solutions

All aqueous solutions were prepared with Milli-Q water ($\rho < 18 \text{ M}\Omega$). Ligand concentrations were determined by adding an excess of zinc(II) solution to the ligand solution and then titrating the metal excess with standardised Na₂H₂EDTA in urotropine buffer (pH 5.6 –5.8) in the presence of Xylenol Orange as an indicator. The concentrations of the metal solutions were determined by complexometric titrations with standardised Na₂H₂EDTA.

The stock solutions of the complexes were prepared by weighing solid products using an AB265-S Mettler Toledo analytical balance (precision 0.01 mg). Manganese complexes were prepared from MnCl₂·4H₂O from Carlo Erba by mixing 1 equivalent of ligand and 1 equivalent of MnCl₂ at pH 7.4 and heating the samples at 60 °C for 30 min. The pH was adjusted either with a buffered solution or by adding KOH (or NaOH) or HCl to the solution. The absence of free Mn²⁺ was checked by the Xylenol Orange test. The concentration of Mn²⁺-containing samples was checked by ICP-OES and/or bulk magnetic susceptibility (BMS) measurements using *tert*-butanol as a probe.²

Potentiometric titrations

Carbonate-free 0.1 M KOH (or NaOH) and 0.1 M HCl were prepared by dilution of concentrated solutions from Fisher Chemicals. Potentiometric titrations were performed in 0.15 M aqueous KCl (or NaCl) under nitrogen atmosphere and the temperature was controlled at 25 ± 0.1 °C with a circulating water bath. The p[H] (p[H] = -log[H⁺], concentration in molarity) was measured in each titration with a combined pH glass electrode (Metrohm) filled with 3 M KCl. The titrant addition was automated by the

use of a 702 SM titrino system (Metrohm). Prior each experiment, the electrode was calibrated as a hydrogen concentration probe by titrating known amounts of HCl with KOH (or NaOH) in 0.1 M electrolyte solution.³ A plot of potential versus p[H] allows the determination of the electrode standard potential (E°) and the slope factor (f). The GLEE program was used for the glass electrode calibration.^{4,5} Continuous potentiometric titrations with 0.1 M KOH (or NaOH) were conducted on aqueous solutions containing 1.5-1.8 mM of ligand in 0.15 M KCl (NaCl) ($V_0 = 5$ mL), with 2 minutes waiting time between successive points. The titrations of the metal complexes were performed with the same ligand solution to which 1 equivalent of the metal cation had been added.

To determine the stability constant of manganese complexes, batch samples (0.5 mL) were prepared between pH = 3.1 and 7.0 at 1:1 Mn:L ratio ($c_{Mn} = c_L = 1.5$ mM, 0.15 M KCl (or NaCl)). The samples were kept at 25°C until the equilibrium state was reached (7 days at pH = 3.17 and ~10 hours at pH = 7).

Experimental data were refined using the computer program Hyperquad 2008.⁶ All equilibrium constants are concentration quotients rather than activities and are defined as:

$$K_{mlh} = \frac{[M_m L_l H_h]}{[M]^m [L]^l [H]^h}$$

The ionic product of water at 25 °C and 0.15 M ionic strength is $pK_w = 13.77$.⁷ Fixed values were used for pK_w , ligand acidity constants and total concentrations of metal, ligand and acid. All values and errors (one standard deviation) reported are at least the average of two independent experiments.

Dissociation kinetic studies

The kinetic inertness of MnL_1 , MnL_2 , MnL_3 , MnL_5 , MnL_6 , MnL_7 and MnL_8 was assessed at 37°C and in 0.1 M KCl, via transmetallation studies of the manganese complexes (1 mM) with Zn^{2+} at pH = 6 (0.030 M MES buffer, in the presence of 10- and 50-fold excess of the exchanging Zn^{2+}), and at pH = 3.13 (0.050 M KH-phthalate buffer), pH = 3.75 and pH = 4.16 (0.03 M dimethyl-piperazine), and pH = 5 (0.030 M N-methylpiperazine), in the presence of 50-fold excess of Zn^{2+} . The excess of the exchanging metal ion guarantees the pseudo-first order conditions. For the duration of the experiments (up to 3 months), the samples were stored in a thermostat at 37 °C and the water proton relaxation rates at 60 MHz was monitored upon time using a Bruker Minispec relaxometer. The pH was controlled for each sample at the end of the kinetic measurements to confirm that it remained stable during the experiment.

The dissociation of MnL_1 was also followed by relaxometry at higher acidities (using 0.01 to 1 M HCl concentrations), without Zn^{2+} (25°C, I = 1 M KCl+HCl). The analysis of the experimental data was performed using Visualiseur/Optimiseur running on a MATLAB 8.3.0 (R2014a) platform.

Relaxometric Measurements

Proton NMRD profiles of manganese complexes were recorded in an aqueous solution ($c_{\text{MnL}} = 1.6 \text{ mM}$, 1.2 mM, 1.4 mM, 1.4 mM, 1.2 mM, 1.3 mM, 1.2 mM and 1.8 mM of MnL_1 , MnL_2 , MnL_4 , MnL_5 , MnL_6 , MnL_7 , MnL_8 and MnL_{10} respectively; pH = 7.0) as well as in human serum for MnL_1 ($c_{\text{MnL}} = 1.17 \text{ mM}$; pH = 7.0) at 25°C and 37 °C on a Stelar SMARTracer Fast Field Cycling relaxometer (0.01-10 MHz) and a Bruker WP80 NMR electromagnet adapted to variable field measurements (20-80 MHz) and controlled by a SMARTracer PC-NMR console. The temperature was monitored by a VTC91 temperature control unit and maintained by a gas flow. The temperature was determined by previous calibration with a Pt resistance temperature probe. For the measurements in serum, a concentrated aqueous solution of MnL_1 (1.6 mM) was diluted tenfold in human serum (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, US).

^{17}O NMR studies

Variable temperature ^{17}O transverse (T_2) relaxation times and chemical shifts of aqueous solution of manganese complexes ($c_{\text{Mn}^{2+}} = 3.4 \text{ mmol/kg}$ (pH = 7.4 mmol), 3.4 mmol/kg (pH = 7.2 mmol), 3.6 mmol/kg, (pH = 7.1), 4.2 mmol/kg (pH = 7.4), 3.5 kg/mmol (pH = 7.0), 4.1 mmol (pH = 7.4), 4.8 kg/mmol (pH = 7.2) for MnL_1 , MnL_2 , MnL_3 , MnL_4 , MnL_5 , MnL_6 , MnL_7 and MnL_8 respectively) were measured using a Bruker ARX 400 spectrometer (9.4 T). As stated before, the absence of free metal ion was checked by the Xylenol Orange test and the concentration of Mn(II) was checked by the chemical shift measurement of *tert*-butanol induced by the magnetic susceptibility. The samples were sealed in a glass sphere fitted into a 10 mm NMR tube to eliminate magnetic susceptibility corrections to the chemical shifts.⁸ To improve sensitivity in ^{17}O NMR, ^{17}O -enriched water (11.10% H_2^{17}O , Cortecnet) was added to the solutions to yield approximately 1% ^{17}O enrichment. An acidified water solution (HClO_4 , pH 3) was used as external reference. It was previously shown that an acidified water reference or the diamagnetic Zn^{2+} analogue of the Mn^{2+} complex measured at the same concentration and pH as the paramagnetic sample give identical results.⁹ The temperature was varied between 273 and 348 K. The temperature was calculated according to previous calibration with ethylene glycol and methanol.⁷ Transverse relaxation times (T_2) were obtained by the Carr-Purcell-Meiboom-Gill spin-echo technique.¹⁰ The technique of the ^{17}O NMR measurements on paramagnetic complexes has been described in details elsewhere.¹¹ The ^{17}O NMR data have been treated according to the Solomon-

Bloembergen-Morgan theory of paramagnetic relaxation using Visualiseur/Optimiseur running on a MATLAB 8.3.0 (R2014a) platform.¹²

In vivo MRI studies and *postmortem* biodistribution by ICP-OES

8-weeks-old C57BL/6JRj wild type females were purchased from Janvier Labs (Le Genes Saint Isle, France). All animal experiments were carried out in accordance with the guidelines for animal experiments and under permission number 20366, from the French “Ministère de l’Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l’Innovation”. Magnetic resonance acquisitions were performed on a 7 T Pharmascan 70/16 superconducting magnet (Bruker, Wissembourg, France) with a shielded gradient set (230 mT.m⁻¹ maximum gradient amplitude) and a transmit-receive quadrature coil with an inner diameter of 38 mm. Animals were anesthetized by inhalation of 2% isoflurane then maintained during MR experiments at 1.5% (0.5 L.min⁻¹ mixed in air and oxygen with 1:1 ratio). The physiological body temperature was maintained inside the magnet by circulating warm water. A pressure sensor was used to monitor the respiration cycle and obtain the respiration frequency for the reconstruction of Ig-FLASH (intragate fast low angle shot) sequence. For organs localization, coronal images were acquired using a gradient echo (Ig-Flash) sequence with the following parameters: TE/TR = 4 ms/200 ms, flip angle = 20°, FOV size = 3.5x3.5 cm, matrix size = 256*256, slice thickness = 1 mm, to display 137x137 μm² in plane resolution for a duration of 4 min (10 accumulations). The Dynamic Contrast Enhancement (DCE) experiment consisted of a T₁-weighted RARE spin echo sequence (Rare factor = 4, field of view = 3*3 cm², matrix = 128*128, TR/TE = 16/500 ms, slice thickness = 700 μm). Two sagittal T₁- weighted images were acquired to cover different organs every 2 minutes during one hour. The contrast agent was manually injected (90 μl; 60 μmol/kg; n = 4) 4 min after the beginning of the acquisition via a catheter placed in the caudal vein. Grey level means in the kidney, muscle, heart, lung, and liver were plotted as a function of time during one hour.

After the MRI scans, three mice were sacrificed, the organs of interest harvested (kidneys, liver, spleen, lungs, brain, muscle, bone, blood) and their Mn content determined by ICP-OES. For comparison purposes, Mn-based biodistribution of non-injected control mice (n = 3) was also performed. ICP-OES measurements were performed with a Jobin Yvon ULTIMA2 Spectrometer (Longjumeau, France). Standard Mn solutions were prepared from a commercial Multi-element solution 1 for ICP (Sigma-Aldrich, France) in 5% HNO₃ matrix. The samples were digested in concentrated HNO₃ for 48 h at room temperature followed by 18 h at 65 °C. The resulting solutions were then diluted 1:12, to reach 5% in HNO₃. Measurements were performed in triplicate, using the most accurate band for Mn (257.610 nm) yielding a calibration curve with R₂ of 0.9997. Data are presented as mean ± SD (n=3).

⁵²Mn studies: Production, purification, radiolabelling and lipophilicity.

⁵²Mn ($t_{1/2} = 5.6$ d) was prepared via irradiation of chromium target by proton beam (14 MeV) at the CEMHTI cyclotron (Orléans, France). ⁵²Mn is produced from the ⁵²Cr(p,n)⁵²Mn nuclear reaction and decays by β^+ to ⁵²Cr.

Production and purification of ⁵²Mn

The Cr target has been designed and optimised as previously reported.¹³ Briefly, a Cr pellet of around 800 μm of thickness (~300 mg) was irradiated during 2 h at 7 μA with a 14 MeV proton beam. Upon irradiation, the irradiated chromium target was dissolved in 5 ml of HCl 32-35%, for 4 h under reflux, followed by the addition of 200 ml of ethanol in order to obtain a final solution of HCl 11M / ethanol (97/3 (v/v)). ⁵²Mn was purified from the bulk chromium by a double separation on columns filled with anion exchange resin AG® 1-X8, ultimately providing ⁵²MnCl₂. An aliquot of the separated fractions was diluted and their radionuclidic purity was assessed by gamma spectrometry with a HPGe detector. For the data acquisition, the samples were placed at a distance of 5 cm from the crystal. The HPGe detector was calibrated in energy and efficiency for this liquid geometry with certified standard radioactive sources (Cerca France). For activity measurements, γ -ray spectrum analysis software package Genie 2000 (Canberra, USA) was used. The ⁵²Mn is recovered as ⁵²MnCl₂ solution at pH \approx 1, the pH is adjusted with NaOH in presence of ascorbic acid immediately before use.

Radiolabelling of L₁

For the radiolabelling, the pH of the ⁵²Mn solution was adjusted to 7 with NaOH in the presence of ascorbic acid. L₁ was added at a 1:10⁴ Mn:L molar ratio and the mixture was incubated for 1 h at 70 °C. The radiochemical purity was followed by thin-layer chromatography (aluminium sheets cover with silica gel 60 F₂₅₄ provided by Merck), using 5 % ammonium acetate in a 1:1 (v/v) mixture of methanol and water as mobile phase. The TLCs are exposed by impregnation on a multisensitive phosphorscreen (Packard, Perkin Elmer, Meriden, USA) and revealed on a Cyclone Storage phosphor system Packard, Perkin Elmer, Shelton, USA). In this system, the free ⁵²Mn does not migrate ($R_f = 0 - 0.1$) while the ⁵²MnL₁ has a R_f of 0.8.

In vitro stability of ⁵²MnL₁

The stability of the radiocomplex ⁵²MnL₁ (pH 7) was studied in presence of different media: water, saline (0.9% NaCl), PBS (Dibelcco, pH 7.4, without Ca and Mg) and HSA 0.6 mM. For this, 20 μL aliquots of the complex were mixed with 200 μl of the medium, the tubes were kept at room temperature

and the complex stability followed by radioTLC (0.3 μ l aliquots). The studies were performed in duplicates.

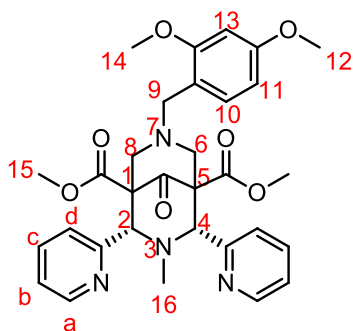
Lipophilicity

Lipophilicity was assessed through the determination of the octanol/saline partition coefficients (log P values), by the “shakeflask” method. Briefly, 100 μ l of each radiocomplex was added to a solution containing 1 ml saline (pH 7.4) (obtained from a saturated octanol solution) and 1 ml of octanol, in triplicate. The resulting solutions were vortexed and centrifuged at 3000 rpm for 10 min. Aliquots of 100 μ L were removed from the octanol phase and from the water phase and the activity measured in a gamma counter. The lipophilicity was calculated as the average log ratio value of the radioactivity in the organic fraction and the aqueous fraction from the three samples.

Synthesis

\mathbf{P}_1^{14} , \mathbf{P}_2^{14} , $\mathbf{2}^{15}$, $\mathbf{4}^{15}$, $\mathbf{6}^{15}$, $\mathbf{8}^{16}$, and $\mathbf{10}^{16}$ were synthesized by protocols from the literature.

Compound 1



Chemical Formula: $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_7$
Molecular Weight: 574.62

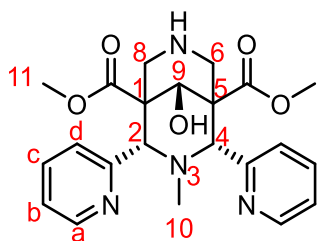
Compound **1** is obtained by an adaptation of the protocols previously described by Hasserodt and Comba.^{15,17} \mathbf{P}_1 (dimethyl-1-methyl-4-oxo-2,6-di(pyridin-2-yl)piperidine-3,5-dicarboxylate, 1750 mg, 4.56 mmol, 1 eq) is dissolved in THF (40 ml). 2,4-Dimethoxybenzylamine (910 mg, 5.45 mmol, 1.2 eq) and formaldehyde 37 % (88 μl , 11 mmol, 2.4 eq) are then added successively. The mixture is heated at reflux for 16 hours and the reaction is monitored by TLC (SiO_2 , DCM/MeOH as eluent). At the end of the reaction, solvent is removed and the solid is washed with hot MeOH yielding **1** as a colourless solid (2.15 g, 83 %).

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1.91 (s, 3H, H16); 2.76 (AB system, $\delta_A = 2.46$; $\delta_B = 3.05$ d, $J_{AB} = 12.0$ Hz, 4H, H6/8); 3.36 (s, 2H, H9); 3.8 (s, 3H, H12/H14), 3.84 (s, 6H, H15), 3.93 (s, 3H, H12/H14); 4.65 (s, 2H, H2 + H4); 6.41 (dd, $J_1 = 8.2$ Hz, $J_2 = 2.5$ Hz, 1H, H11); 6.57 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H13); 7.02 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H10); 7.1 (m, 2H, Hb); 7.46 (td, $J_1 = 7.8$ Hz, $J_2 = 1.9$ Hz, 2H, Hc); 7.98 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, Hd); 8.34 (m, 2H, Ha).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 126 MHz): δ 43.24; 52.48; 55.56; 55.82; 59.08; 62.11; 74.04; 98.79; 103.79; 117.77; 122.84; 123.74; 133.2; 136.16; 148.90; 158.75; 159.35; 160.77; 168.68; 204.09.

Mass Spectroscopy (ESI⁺/MS): $m/z = 575.25$ Da $[\text{M} + \text{H}]^+$, calculated for $[\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_7]^+$: 575.25 Da.

Compound 5



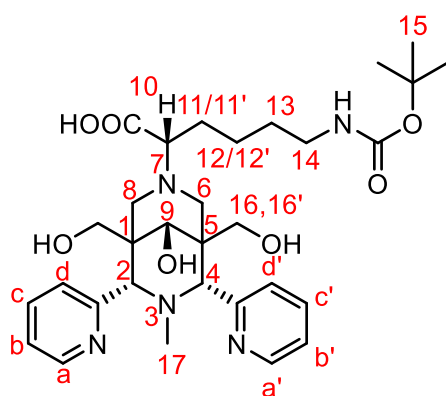
Chemical Formula: $C_{22}H_{26}N_4O_5$
Molecular Weight: 426.47

Compound **5** is already described in the literature¹⁸ but the protocol was optimized to improve the yield and reproducibility of the reaction.

In a solution of **1** (6.56 g, 11,4 mmol, 1 eq) in THF at -78°C , 0.33 eq of sodium borohydride (0.28 g, 7.52 mmol, 0.66 eq in total) is added two times at 2 hours of interval and the mixture is stirred at -78°C for 2 hours. At the end, the reaction is quenched with 40 ml of NH_4Cl and the solvent is removed under vacuum. The DCM is added, salts are filtered and the solvent is removed under vacuum. The crude product is used for the next step without purification and it is dissolved in a mixture of DCM (15 ml) and TFA (10 ml). The mixture is stirred at reflux for 16 hours. At the end, the solvent is evaporated and the crude product is dissolved in 20 ml of MeOH and stirred at reflux for 2 hours. A white precipitate is obtained, which is then filtered and the solvent of the solution is removed under vacuum. Finally, the crude product is purified by FPLC (SiO_2 , 100 % DCM to 80/20 DCM/MeOH) to give **5** (1.62 g) with a 33 % yield.

^1H NMR (MeOD, 400 MHz): δ 1.53 (s, 3H, H10); 3.60 (s, 6H, H11); 3.96 (AB system, $\delta_A = 3.60$, $\delta_B = 4.31$, $J_{AB} = 13.4$ Hz, 4H, H6/8_{ax} + H6/8_{eq}); 4.53 (s, 1H, H9); 4.75 (s, 2H, H2/4); 7.35(m, 2H, Hb/b'); 7.54 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, Hd/d'); 7.97 (td, $J_1 = 7.6$ Hz, $J_2 = 1.9$ Hz, 2H, Hc/c'); 8.64 (m, 2H, Ha/a').

Compound 9



Chemical Formula: $C_{31}H_{45}N_5O_7$
Molecular Weight: 599.73

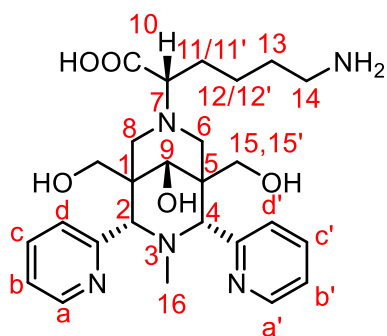
In a solution of **7** (250 mg, 0.38 mmol, 1 eq) in 20 ml of THF and 2 ml of MeOH, 3 eq of $LiBH_4$ (82 mg, 3.76 mmol, 10 eq) are added in two times at 1 hour of interval and the mixture is stirred during 3 hours at room temperature. The reaction is monitored by TLC on C_{18} using $H_2O/MeOH$ (90/10) as eluent. At the end, the reaction is quenched with $NH_4Cl_{(aq)}$ (5 ml) and the solvents are removed under vacuum. DCM is added and the salts are filtered. The solvent is evaporated, and the crude product is purified by FPLC (C_{18} , 95/5 H_2O/ACN ,

to 100 % ACN) to give **9** (170 mg) with a 75 % yield.

1H NMR (MeOD, 400 MHz): δ 1.42 (m, 15H, H15 + H11/11' + H12/12' + H13); 1.72 (s, 3H, H17); 2.13 (AB system, $\delta_A = 1.67$, $\delta_B = 2.6$, $J_{AB} = 11.3$ Hz, 2H, H6/8_{ax} + H6/8_{eq}); 2.29 (dd, $J_1 = 10.2$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, 1H, H10); 2.31 (AB system, $\delta_A = 1.82$, $\delta_B = 2.79$, $J_{AB} = 11.3$ Hz, 2H, H6/8_{ax} + H6/8_{eq}); 3.00 (m, 2H, H14); 3.16 (AB system, $\delta_A = 2.86$, $\delta_B = 3.45$, $J_{AB} = 11.0$ Hz, 2H, H16/16'); 3.32 (AB system, $\delta_A = 3.09$, $\delta_B = 3.56$, $J_{AB} = 11.0$ Hz, 2H, H16/16'); 4.07 (s, 1H, H2/4); 4.12 (s, 1H, H9); 4.13 (s, 1H, H2/4); 7.36 (m, 4H, Hb/b' + Hd/d'); 7.74 (m, 2H, Hc/c'); 8.71 (m, 2H, Ha/a').

^{13}C NMR (MeOD, 126 MHz): δ 23.37 (CH₂lys); 27.48(C15); 29.7(CH₂-lys); 29.95 (CH₂-lys); 39.84 (C14); 41.93 (C⁴); 42.56(C17 + C⁴); 52.03 (C6/8); 54.99 (C6/8); 65.02 (C16/16'); 65.50 (C16/16'); 67.42 (C2/4); 68.15 (C2/4); 72.68 (C9); 75.23 (C10); 78.42 (C⁴); 122.59 (Cb/b'); 122.95 (Cb/b'); 125.24 (Cd/d'); 125.70 ((Cd/d'); 136.44 (Cc/c'); 136.60 (Cc/c'); 149.81 (Ca/a'); 150.03 (Ca/a'); 157.10 (C⁴); 158.98 (C⁴); 159.63 (C⁴); 179.55 (C⁴).

Mass Spectrometry: (ESI⁺/MS): $m/z = 600.34$ Da $[M + H]^+$, calculated for $[C_{31}H_{46}N_5O_7]^+$: 600.34 Da.

Ligand **L**₂

TFA (2 ml) is added to a solution of **9** (170 mg, 0.28 mmol, 1 eq) in 7 ml of DCM. The mixture is stirred for 16 hours at room temperature. At the end of the reaction, the solvent is removed under vacuum and the crude product is purified by FPLC (C₁₈, , 97/3 H₂O/ACN, 0.1 % TFA to 100 % ACN, 0.1 % TFA) to give **L**₂.3TFA (160 mg) with a 68 % yield.

Chemical Formula: C₂₆H₃₇N₅O₅

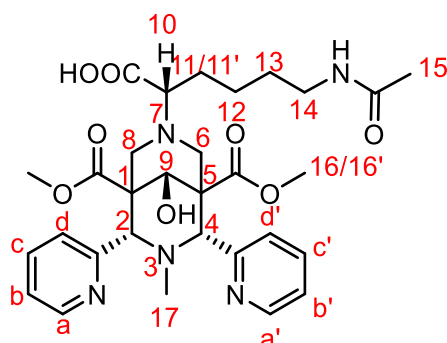
Molecular Weight: 499.61

¹H NMR (MeOD, 400 MHz): δ 1.60 (m, 2H H11/11'); 1.90 (m, 3H, H12/12' + H13); 2.29 (m, 4H, H16 + H12/12'); 2.68 (AB system, δ_A = 2.59 , δ_B = 2.77, J_{AB} = 11.7 Hz, 2H, H6/8_{ax} + H6/8_{eq}); 2.80 (AB system, δ_A = 2.53 , δ_B = 3.07, J_{AB} = 11.7 Hz, 2H, H6/8_{ax} + H6/8_{eq}); 3.03 (m, 2H, H14); 3.34 (AB system, δ_A = 3.12, δ_B = 3.55, J_{AB} = 11.0 Hz, 2H, H15/15' + H15/15'); 3.37 (AB system, δ_A = 3.19, δ_B = 3.55, J_{AB} = 11.0 Hz, 2H, H15/15' + H15/15'); 3.37 (dd, J₁ = 9.5 Hz, J₂ = 4.5 Hz, 1H, H10); 4.29 (s, 1H, H9); 5.12 (s, 1H, H2/4); 5.18 (s, 1H, H2/4); 7.56 (m, 4H, Hd/d' + Hb/b'); 7.94 (m, 2H, Hc/c'); 8.80 (m, 2H, Ha/a').

¹³C NMR (MeOD, 126 MHz) : δ 23.73 (CH₂lys); 27.42 (CH₂lys); 28.47 (CH₂lys); 39.32 (C14); 41.29(C17); 42.74 (C⁴); 43.11 (C⁴); 48.60 (C6/8); 54.39 (C6/8); 63.57 (C15/15'); 63.70 (C15/15'); 66.69 (C10); 67.71 (C2/4); 68.18 (C2/4); 71.70 (C9); 124.47 (Cb/b'); 124.53 (Cb/b'); 125.52 (Cd/d'); 125.65 (Cd/d'); 137.57 (Cc/c'); 149.47 (Ca/a'); 150.00 (Ca/a'); 151.60 (C⁴); 172.36 (C⁴).

Mass Spectrometry: (ESI⁺/MS): m/z = 500.29 Da [M + H]⁺, calculated for [C₂₆H₃₈N₅O₅]⁺: 500.29 Da.

Elemental Analysis: Calculated for C₂₆H₃₇N₅O₅.3TFA: C, 45.80, H, 4.94, N, 8.48. Found: C, 45.66, H, 4.79, N, 8.32.

Compound **11**

Chemical Formula: C₃₀H₃₉N₅O₈
Molecular Weight: 597.67

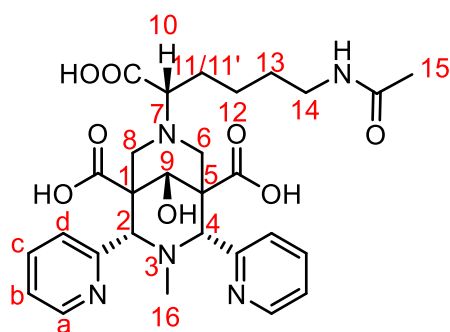
This synthesis was adapted from an already described protocol.¹⁶ N-methylmorpholine (132 μ l, 1.2 mmol, 4 eq) and N-succinimidyl acetate (59.7 mg, 0.38 mmol, 1.3 eq) are added to a solution of **10** (200 mg, 0.3 mmol, 1 eq) in 10 ml of DMF. The mixture is stirred for 16 hours at room temperature. At the end, the solvent is removed under vacuum and the crude product is purified by FPLC (C₁₈, 90/10 H₂O/ACN to 100 % ACN) to give **11** (90 mg) with a 50 % yield.

¹H NMR (MeOD, 400 MHz): δ 1.69 (m, 8H, H17 + H12 + H13); 1.90 (s, 3H, H15); 2.16 (m, 1H, H11/11'); 2.33 (m, 1H, H11/11'); 3.21 (m, 2H, H14); 3.57 (s, 3H, H16/16'); 3.63 (s, 3H, H16/16'); 3.76 (m, 1H, H10); 3.91 (AB system, $\delta_A = 3.84$, $\delta_B = 3.97$, $J_{AB} = 12.2$ Hz, 2H, H6/8_{ax} + H6/8_{eq}); 4.14 (AB system, $\delta_A = 4.01$, $\delta_B = 4.26$, $J_{AB} = 12.2$ Hz, 2H, H6/8_{ax} + H6/8_{eq}); 4.49 (s, 1H, H9); 4.87 (s, 1H, H2/4); 4.92 (s, 1H, H2/4); 7.39 (m, 2H, Hb/b'); 7.60 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Hd/d'); 7.83 (m, 2H, Hc/c'); 8.65 (m, 2H, Ha/a'); 8.68 (m, 2H, Ha/a').

¹³C NMR (MeOD, 126 MHz): δ 22.75 (C15); 25.47 (CH₂-lys); 30.24 (CH₂-lys); 30.42 (CH₂-lys); 40.52 (CH₂-lys); 41.92 (C17); 51.40 (C6/8); 52.54 (C⁴); 52.59 (C⁴); 53.15 (C16/16'); 53.25 (C16/16'); 57.01 (C6/8); 67.62 (C2/4); 68.04 (C2/4); 72.12 (C10); 74.04 (C9); 125.11 (Cb/b'); 125.17 (Cb/b'); 128.81 (Cd/d'); 128.88 (Cd/d'); 138.24 (Cc/c'); 138.37 (Cc/c'); 150.35 (Ca/a'); 150.85 (Ca/a'); 157.80 (C⁴); 157.95 (C⁴); 170.21 (C⁴); 170.62 (C⁴); 173.18 (C⁴); 173.25 (C⁴).

Mass Spectrometry: (ESI⁺/MS): $m/z = 598.29$ Da [M + H]⁺, calculated for [C₃₀H₄₀N₅O₈]⁺: 598.29 Da.

Ligand L3

Chemical Formula: C₂₈H₃₅N₅O₈

Molecular Weight: 569.62

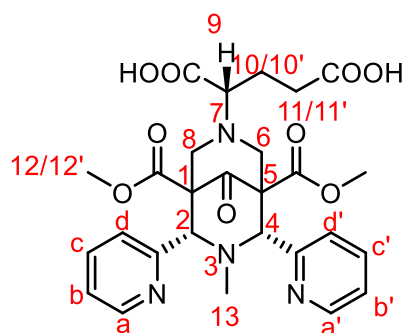
Lithium hydroxide (32 mg, 35 mmol, 5eq) is dissolved in a solution of **11** (160 mg, 0.27 mmol, 1 eq) in a mixture of THF (3 ml) and H₂O (7 ml). The mixture is stirred at room temperature for 16 hours. At the end, the solvent is removed under vacuum. The crude product is dissolved in a minimum of water, the pH of the solution is lowered at 2 and the compound is then purified by FPLC (C₁₈, 97/3 H₂O/ACN to 100 % ACN) to give L₃.0.5LiCl (110 mg) with a 69 % yield.

¹H NMR (D₂O, 600 MHz): δ 1.52 (m, 2H, H12); 1.68 (m, 2H, H13); 1.89 (s, 3H, H16); 1.93 (s, 3H, H15); 1.96 (m, 1H, H11/11'); 2.18 (m, 1H, H11/11'); 3.35 (AB system δ_A = 3.08, δ_B = 3.62, 2H, H6/8_{ax} + H6/8_{eq}); 3.52 (AB system δ_A = 3.23, δ_B = 3.82, 2H, H6/8_{ax} + H6/8_{eq}); 3.23 (m, 2H, H14); 3.62 (m, 1H, H10); 4.26 (s, 1H, H9); 4.90 (m, 2H, H2/4); 7.42 (m, 2H, Hb); 7.55 (m, 2H, Hd); 7.84 (m, 2H, Hc); 8.59 (m, 2H, Ha).

¹³C NMR (D₂O, 150 MHz): δ 21.85 (C15); 23.25 (CH₂-lys); 28.06 (CH₂-lys); 28.21 (CH₂-lys); 39.23 (CH₂-lys); 41.90 (C16); 50.19 (C⁴); 50.72 (C⁴); 52.07 (C6/8); 54.79 (C6/8); 67.84 (C2/4); 68.00 (C2/4); 71.42 (C10); 72.98 (C9); 123.86 (Cb/b' + Cb/b'); 125.19 (Cd/d'); 126.34 (Cd/d'); 137.59 (Cc/c'); 137.64 (Cc/c'); 148.83 (Ca/a'); 149.09 (Ca/a'); 155.59 (C⁴); 155.76 (C⁴); 173.88 (C⁴); 174.48 (C⁴); 175.00 (C⁴); 175.61 (C⁴).

Mass Spectrometry: (ESI⁺/MS): m/z = 570.25 Da [M + H]⁺ calculated for [C₂₈H₃₆N₅O₈]⁺: 570.25 Da.

Elemental Analysis: Calculated for C₂₈H₃₅N₅O₈.0.5(LiCl), C, 56.92, H, 5.97, N, 11.85. Found: C, 56.82, H, 6.01, N, 11.96.

Compound **12**

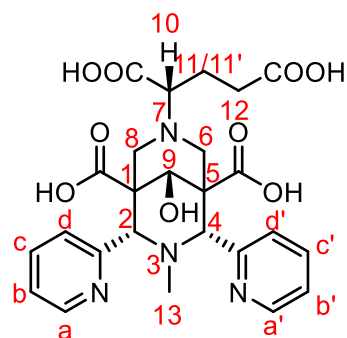
Chemical Formula: $C_{27}H_{30}N_4O_9$
Molecular Weight: 554.56

This synthesis was adapted from the protocol previously developed for L-lysine.¹⁶ L-glutamic acid (422 mg, 2.87 mmol, 1.1 eq), $NaHCO_3$ (241.5 mg, 2.87 mmol, 1.1 eq) and formaldehyde 37 % (635 μ l, 8.52 mmol, 3.3 eq) are added to a solution of **P**₁ (1 g, 2.61 mmol, 1 eq) in MeOH and the mixture is stirred at reflux for 2 days. At the end of the reaction, the solvent is removed under vacuum and the crude product is precipitated in CH_3CN to give **12** (500 mg) as a white powder with a 34 % yield.

¹H NMR (MeOD, 400 MHz): δ 1.86 (m, 4H, H13 + H10/10'); 2.22 ppm (m, 1H, H10/10'); 2.24 (m, 1H, H11/11'); 2.37 (m, 1H, H11/11'); 2.56 (m, 2H, H6/8 + H9); 2.77 (m, 1H, H6/8); 3.40 (m, 1H, H6/8); 3.58 (m, 1H, H6/8); 3.69 (s, 3H, H12/12'); 3.76 (s, 3H, H12/12'); 4.65 (s, 1H, H2/4); 4.74 (s, 1H, H2/4); 7.34 (m, 2H, Hb/b'); 7.41 (m, 1H, Hd/d'); 7.44 (m, 1H, Hd/d'); 7.84 (m, 2H, Hc/c'); 8.84 (m, 2H, Ha/a').

¹³C NMR (MeOD, 126 MHz): δ 27.02 (C10); 33.87 (C11); 41.84 (C13); 51.66 (C12/12'); 51.86 (C12/12'); 55.62; (C6/8); 57.37 (C6/8); 62.75 (C⁴); 62.82 (C⁴); 72.24 (C2/4); 72.50 (C2/4); 73.92 (C9); 123.78 (Cb/b'); 124.10 (Cb/b'); 124.74 (Cd/d'); 124.86 (Cd/d'); 137.60 (Cc/c'); 137.83 (Cc/c'); 150.40 (Ca/a'); 150.58 (Ca/a'); 155.96 (C⁴); 156.21 (C⁴); 167.34 (C⁴); 167.70 (C⁴); 177.59 (C⁴); 179.36 (C⁴); 202.15 (C⁴).

Ligand L4



Chemical Formula: $C_{25}H_{28}N_4O_9$
Molecular Weight: 528.52

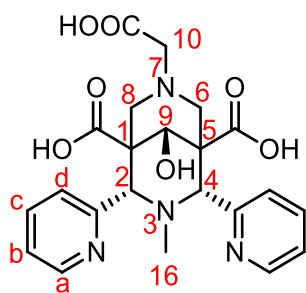
In a solution of **12** (500 mg, 0.90 mmol, 1 eq) in MeOH at -78 °C, sodium borohydride (32 mg, 0.85 mmol, 0.94 eq in total) is added three times (0.25 eq, 0.25 eq and 0.5 eq the third time) at 1 hour of interval and the mixture is stirred at -78 °C for 2 hours. After two hours, the reaction is quenched with NH_4Cl (5 ml) and the solvent is removed under vacuum. Then, DCM is added and the salts are filtered. The solvent is evaporated and the crude product is purified by reverse phase FPLC (C_{18} , CH_3CN/H_2O). The desired product can be identified in the NMR spectra but others species that was attribute to a partial hydrolysis of the methylester groups are present so the mixture was engaged in the deprotection step without any further purification. The isolated product (200 mg) is then dissolved in a mixture of THF (3 ml) and H_2O (7 ml). Lithium hydroxide (32 mg, 1.34 mmol) is added and the mixture is stirred at room temperature for 16 hours. The reaction is monitored by TLC on C_{18} using MeOH/ H_2O as eluent. At the end of the reaction, the solvent is removed under vacuum and the crude product is dissolved in a minimum of water to adjust the pH at 2. The solution is finally purified by FPLC (C_{18} , 97/3 $H_2O/MeOH$ to 50/50 $H_2O/MeOH$) to give **L4.2H₂O** (100 mg) with a 20 % yield.

1H NMR (MeOD, 400 MHz): δ 2.11 (m, 1H, H11/11'); 2.21 (s, 3H, H13); 2.41 (m, 1H, H11/11'); 2.79 (m, 2H, H12); 2.95 (m, 1H, H6/8); 3.10 (m, 2H, H6/8); 3.36 (m, 1H, H6/8); 3.48 (m, 1H, H10); 4.3 (s, 1H, H9); 5.29 (s, 2H, H2/4); 7.57 (m, 2H, Hb/b'); 7.70 (m, 2H, Hd/d'); 7.99 (m, 2H, Hc/c'); 8.75 (m, 2H, Ha/a').

^{13}C NMR (D_2O , 150 MHz): δ 24.53; 31.08; 41.73; 50.34; 51.05; 56.08; 63.03; 67.44; 67.68; 68.06; 73.65; 123.60 (2CH); 126.03; 126.28; 137.06 (2CH); 148.74; 149.11; 154.39; 154.58; 171.96; 173.39; 173.89; 175.83.

Mass Spectrometry: (ESI⁺/MS): $m/z = 529.19$ Da $[M + H]^+$, calculated for $[C_{25}H_{30}N_4O_9]^+$: 529.19 Da.

Elemental Analysis: Calculated for $C_{25}H_{28}N_4O_9 \cdot 2(H_2O)$, C, 53.19, H, 5.71, N, 9.92. Found: C, 53.07, H, 5.59, N, 10.06.

Ligand **L5**

Chemical Formula: $C_{22}H_{24}N_4O_7$
Molecular Weight: 456.46

The synthesis of ligand **L5** has already been described.¹⁹ However, this time the ligand was not obtained by double-Mannich reaction as before but by a new protocol involving the nucleophilic substitution of the intermediate **5**. Potassium carbonate (163 mg, 1.18 mmol, 2.4 eq) is dissolved in a solution of **5** (210 mg, 0.49 mmol, 1 eq) in 25 ml of anhydrous ACN under argon. Then, ethyl bromoacetate (66 μ l, 0.59 mmol, 1.2 eq) is added and the mixture is heated at

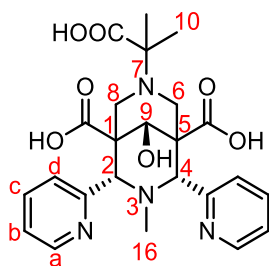
80 °C for 16 hours. At the end, K_2CO_3 is filtered and solvent is removed under vacuum. The product is used for the next step without purification. The crude product is dissolved in a mixture of H_2O (10 ml) and THF (5 ml) and lithium hydroxide is added (59 mg, 2.45 mmol, 5 eq). The solution is stirred for 16 hours at room temperature. At the end, the solvent is evaporated and the crude product is dissolved in a minimum of H_2O and the pH is lowered to 2. The solution is then purified by FPLC (C_{18} , 97/3 H_2O /MeOH to 50/50 H_2O /MeOH) to give **L2.HCl** (124 mg) with 51 % a yield.

1H NMR (MeOD, 400 MHz): δ 1.82 (s, 3H, H16); 2.49 (AB system, $\delta_A = 2.17$, $\delta_B = 2.82$, $J_{AB} = 12.4$ Hz, 4H, H6/8_{ax} + H6/8_{eq}); 2.81 (s, 2H, H10); 3.90 (s, 1H, H9); 4.66 (s, 2H, H2/4); 7.23 (m, 2H, Hb); 7.51 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, Hd); 7.67 (td, $J_1 = 7.6$ Hz, $J_2 = 1.9$ Hz, 2H, Hc); 8.65 (m, 2H, Ha).

^{13}C NMR (MeOD, 126 MHz): δ 43.08; 56.80; 59.87; 69.93; 74.84; 124.73; 127.53; 127.70; 138.46; 139.41; 150.27; 158.60; 161.62.

Elemental Analysis: Calculated for $C_{22}H_{24}N_4O_7.HCl$, C, 53.61, H, 5.11, N, 11.37. Found: C, 54.01, H, 5.33, N, 11.22.

Mass Spectrometry: (ESI⁻/MS): $m/z = 455.15$ Da $[M - H]^-$, calculated for $[C_{22}H_{23}N_4O_7]^-$: 455.16 Da.

Ligand **L6**

Chemical Formula: $C_{24}H_{28}N_4O_7$
Molecular Weight: 484.51

Potassium carbonate (106.4 mg, 0.77 mmol, 1.1 eq) is dissolved in a solution of **5** (300 mg, 0.70 mmol, 1 eq) in 30 ml of anhydrous ACN under argon. Then methyl 2-bromo-2-methylpropionate (100 μ l, 0.77 mmol, 1.1 eq) is added and the mixture is heated at 80 °C for 16 hours. At the end, K_2CO_3 is filtered and solvent is removed under vacuum. The product is used for the next step without purification. The crude product is dissolved in a mixture of H_2O (20 ml) and THF (10 ml) and lithium hydroxide (83.82 mg, 3.5 mmol, 5 eq) is added. The solution is stirred for 16 hours at room temperature. At the end, the solvent is evaporated and the crude product is dissolved in a minimum of H_2O and the pH is lowered to 2 with aqueous HCl. The solution is then purified by FPLC (C_{18} , 97/3 H_2O /MeOH to 50/50 H_2O /MeOH) to give **L6**.2HCl.0.5 H_2O (125 mg) with a 31 % yield.

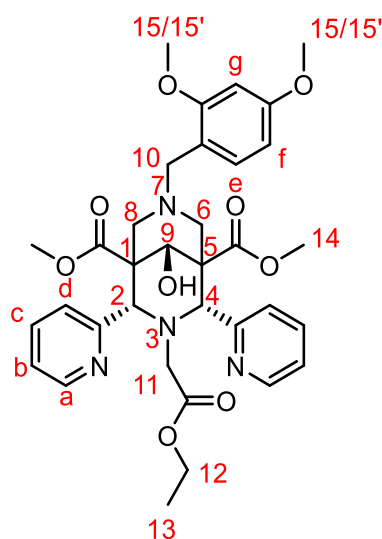
1H NMR (MeOD, 400 MHz) : δ 1.13 (s, 6H, H11); 2.08 (s, 3H, H10); 2.50 (AB system, $\delta_A = 2.39$, $\delta_B = 2.60$, $J_{AB} = 12.8$ Hz, 4H, H6/8_{ax} + H6/8_{eq}); 4.11 (s, 1H, H9); 5.03 (s, 2H, H2 + H4); 7.66 (m, 4H, Hb + Hd); 8.06 (td, $J_1 = 7.9$ Hz, $J_2 = 1.3$ Hz, 2H, Hc); 8.73 (m, 2H, Ha).

^{13}C NMR (MeOD, 126 MHz): δ 23.15; 46.61; 51.41; 53.23; 53.79; 67.70; 68.74; 75.18; 128.14; 128.93; 142.13; 150.87; 157.81; 178.60; 186.65.

Mass Spectrometry: (ESI⁺/MS): $m/z = 485.19$ Da $[M + H]^+$, calculated for $[C_{24}H_{29}N_4O_7]^+$: 485.20 Da.

Elemental Analysis: Calculated for $C_{24}H_{28}N_4O_7 \cdot 2HCl \cdot 0.5H_2O$, C, 50.89, H, 5.52, N, 9.89.
Found: C, 50.77, H, 5.71, N, 10.33.

Compound 16



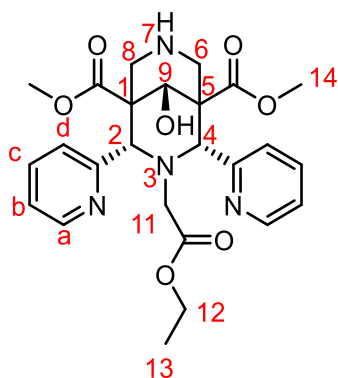
Chemical Formula: $C_{34}H_{40}N_4O_9$
Molecular Weight: 648.70

Potassium carbonate (88 mg, 0.64 mmol, 1.2 eq) is dissolved in a solution of **4** (300 mg, 0.53 mmol, 1 eq) in 30 ml of anhydrous ACN under argon. Then ethyl bromoacetate (71 μ l, 0.64 mmol, 1.2 eq) is added and the mixture is heated at 80 °C for 16 hours. At the end, K_2CO_3 is filtered and solvent is removed under vacuum. The product is used for the next step without purification.

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) : δ (1.13 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H13); 2.57 (s, 2H, H10); 3.51 (s, 6H, H14); 3.73 (s, 3H, H15/15'); 3.88 (s, 3H, H15/15'); 4.01 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, H12); 4.28 (m, 4H, H6 + H8); 4.64 (s, 2H, H10); 4.98 (s, 1H, H9); 5.58 (s, 2H, H2 + H4); 6.53 (dd, $J_1 = 8.4$ Hz, $J_2 = 2.4$ Hz, 1H, Hf); 6.60 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, Hg); 7.18 (m, 2H, Hb); 7.30 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, Hd); 7.55 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, He); 7.61 (td, $J_1 = 7.9$ Hz, $J_2 = 1.7$ Hz, 2H, Hc); 8.27 (m, 2H, Ha).

Mass Spectrometry: (ESI⁺/MS): $m/z = 649.28$ Da $[M + H]^+$, calculated for $[C_{34}H_{41}N_4O_9]^+$: 649.28 Da.

Compound 17



Chemical Formula: $C_{25}H_{30}N_4O_7$
Molecular Weight: 498.54

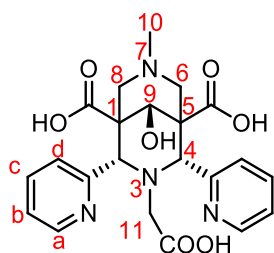
The crude product of **16** (0.44 mmol) is dissolved in a mixture of TFA (5 ml) and DCM (10 ml) and the solution is heated for 16 hours at reflux. At the end the solvent is removed under vacuum. Then, the crude product is dissolved in MeOH and heated under vacuum. A white precipitate is obtained. The precipitate is filtered and the solvent is removed under vacuum. The crude product is finally purified by FPLC (SiO_2 , DCM/MeOH) to give **17**.2TFA (135 mg) with a 42 % yield.

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) : δ 1.09 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, H13); 2.61 (s, 2H, H11); 3.51 (m, 8H, H14 + H6/ δ_{ax}); 3.97 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, H12); 4.30 (m, 2H, H6/ δ_{eq}); 4.57 (s, 1H, H9); 5.59 (s, 2H, H2/4); 7.26 (m, 2H, Hb); 7.31 (m, 2H, Hd); 7.64 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, Hc); 8.68 (m, 2H, Ha).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 126 MHz): δ 14.16; 46.44; 49.13; 49.91 ; 52.86; 60.46; 62.29; 72.55; 123.88; 126.36; 137.01; 150.22; 156.09; 169.53; 170.20.

Mass Spectrometry: (ESI⁺/MS): $m/z = 499.22$ Da $[M + H]^+$, calculated for $[C_{25}H_{31}N_4O_7]^+$: 499.21 Da.

Elemental Analysis: Calculated for $C_{25}H_{30}N_4O_7 \cdot 2(CF_3COOH)$, C, 47.94, H, 4.44, N, 7.71.
Found: C, 47.61, H, 4.5, N, 7.49.

Ligand **L7**Chemical Formula: C₂₂H₂₄N₄O₇

Molecular Weight: 456.46

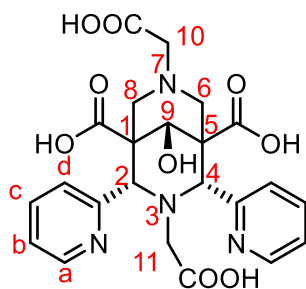
Potassium carbonate (131 mg, 0.95 mmol, 1.2 eq) is dissolved in a solution of **17** (390 mg, 0.79 mmol, 1 eq) in 40 ml of anhydrous ACN under argon. Then iodomethane (59 μ l, 0.95 mmol, 1.2 eq) is added and the mixture is heated at 80 °C for 16 hours. Then, K₂CO₃ is filtered and the solvent is removed under vacuum. The crude product is then used for the next step without purification and dissolved in a mixture of H₂O (30 ml) and THF (20 ml). Lithium hydroxide (128 mg, 5.35 mmol, 5 eq) is added. The solution is stirred for 16 hours at room temperature. At the end, the solvent is evaporated, the crude product is dissolved in a minimum of water and the pH is lowered to 2. The solution is then purified by FPLC (C₁₈, 97/3 H₂O/MeOH to 50/50 H₂O/MeOH) to give **L7**·HCl·0.5·H₂O (160 mg) with a 41 % yield.

¹H NMR (MeOD, 400 MHz): δ 2.62 (s, 2H, H11), 3.04 (s, 3H, H10); 3.80 (AB system, $\delta_A = 3.39$, $\delta_B = 4.21$, $J_{AB} = 12.7$ Hz, 4H, H6/ δ_{ax} + H6/ δ_{eq}); 4.41 (s, 1H, H9); 5.72 (s, 2H, H2/H4); 7.35 (m, 2H, Hb); 7.46 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, Hd); 7.76 (m, 2H, Hc); 8.69 (m, 2H, Ha).

¹³C NMR (MeOD, 126 MHz): δ 41.88; 49.55; 49.66; 57.57, 62.61; 72.87; 123.40; 127.07; 137.02; 149.33; 157.28; 171.57; 172.39.

Elemental Analysis: Calculated for C₂₂H₂₄N₄O₇·HCl·0.5H₂O C, 52.65, H, 5.22, N, 11.16. Found: C,52.80, H, 5.32, N, 11.61.

Mass Spectrometry: (ESI/MS): $m/z = 455.15$ Da [M - H]⁻ : calculated for [C₂₂H₂₃N₄O₇]⁻: 455.15 Da.

Ligand **L8**

Chemical Formula: $C_{23}H_{24}N_4O_9$
Molecular Weight: 500.46

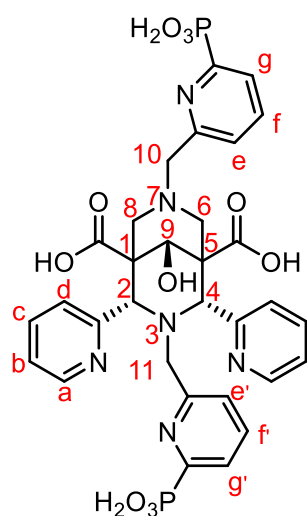
Potassium carbonate (212 mg, 1.53 mmol, 2.4 eq) is dissolved in a solution of **6** (263 mg, 0.64 mmol, 1 eq) in 50 ml of anhydrous ACN under argon. Then, ethyl bromoacetate (182 μ l, 1.6 mmol, 2.5 eq) is added and the mixture is heated at 80 °C for 16 hours. At the end, K_2CO_3 is filtered and the solvent is removed under vacuum. The product is used for the next step without purification. The crude product is dissolved in a mixture of H_2O (10 ml) and THF (5 ml) and lithium hydroxide (123 mg, 5.12 mmol, 8 eq). The solution is stirred for 16 hours at room temperature. At the end, the solvent is evaporated and the crude product is purified by FPLC (C_{18} , 97/3 $H_2O/MeOH$ to 50/50 $H_2O/MeOH$) to give **L8**. 2 $LiOH \cdot H_2O$ (150 mg) with a 41 % yield.

1H NMR (MeOD, 400 MHz) : δ 2.82 (s, 2H, H10/H11); 3.68 (AB system, $\delta_A = 3.60$, $\delta_B = 3.75$, 4H, H6/8_{ax} + H6/8_{eq}); 3.75 (s, 2H, H10/H11); 4.42 (s, 1H, H9); 5.75 (s, 2H, H2/H4); 7.36 (m, 2H, Hb); 7.65 (m, 2H, Hd); 7.80 (m, 2H, Hc); 8.67 (m, 2H, Ha).

^{13}C NMR (D_2O , 150 MHz): δ 50.83; 56.27; 59.10; 64.07; 72.81; 124.66; 127.54; 140.64; 146.92; 155.00; 170.92; 174.71; 176.56.

Mass Spectrometry: (ESI/MS): $m/z = 499.14 [M - H]^-$; 505.15 Da $[M - 2H + Li]^-$, calculated for $[C_{23}H_{23}N_4O_9]^-$: 499.14 Da ; $[C_{23}H_{22}N_4O_9Li]^-$: 505.16 Da

Elemental Analysis: Calculated for $C_{23}H_{24}N_4O_9 \cdot 2(LiOH) \cdot H_2O$, C, 48.78, H 4.98, N, 9.89. Found: C,48.78, H, 5.02, N, 10.16.

Ligand L₉

Chemical Formula: C₃₁H₃₂N₆O₁₁P₂
Molecular Weight: 726.58

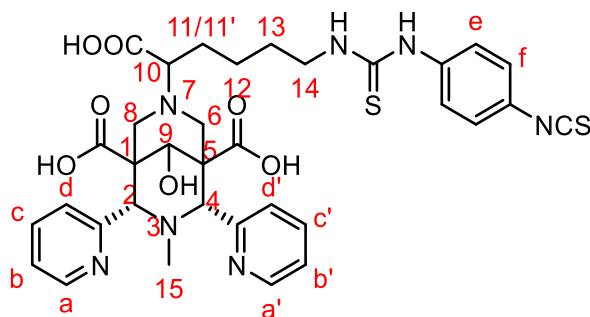
Potassium bicarbonate (111 mg, 0.80 mmol 2.2 eq) and chloromethylpyridinephosphonate **20**²⁰ (211 mg, 0.80 mmol, 2.2 eq) is added to a solution of **6** (150 mg, 0.36 mmol, 1eq) in 40 ml of anhydrous acetonitrile under argon. The mixture is stirred for 16 hours at 60 °C. At the end, K₂CO₃ is filtered and the solvent is removed under vacuum. The crude product is used without purification for the next step. It is therefore dissolved in 10 ml of 6M HCl and stirred for 16 hours at 80 °C. Then, the solvent is evaporated and the product is purified by FPLC (C₁₈, using H₂O/ACN gradient from 97/3 to 80/20) to give L₉. 3 HCl. 2.5 H₂O (96 mg) with a 30 % yield.

¹H NMR (D₂O, 400 MHz): δ 3.55 (m, 2H, H6/8); 3.89 (s, 4H, H10+H11); 4.54 (s, 1H, H9); 4.81 (m, 2H, H6/8); 5.19 (m, 2H, H2/4); 6.82 (br, 1H, He/e'); 7.28 (br, 2H, Hb); 7.51 (br, 2H, Hd); 7.85 (br, 2H, Hc); 7.91 (m, 1H, He/e'); 8.00 (m, 2H, Hf/f' + Hg/g'); 8.18 (m, 1H, Hf/f'); 8.22 (m, 3H, Hg/g' + Ha/a').

³¹P NMR (D₂O, 162 MHz): δ 6.49.

Mass Spectrometry: (ESI⁺/MS): m/z = 727.17 Da [M + H]⁺, calculated for [C₃₁H₃₃N₆O₁₁P₂]⁺: 727.17 Da.

Elemental Analysis: Calculated for C₃₁H₃₂N₆O₁₁P₂.3(HCl).2.5(H₂O), C, 42.26, H 4.58, N, 9.54. Found: C,42.33, H, 4.75, N, 9.77.

Ligand L₁₁Chemical Formula: C₃₄H₃₇N₇O₇S₂

Molecular Weight: 719.83

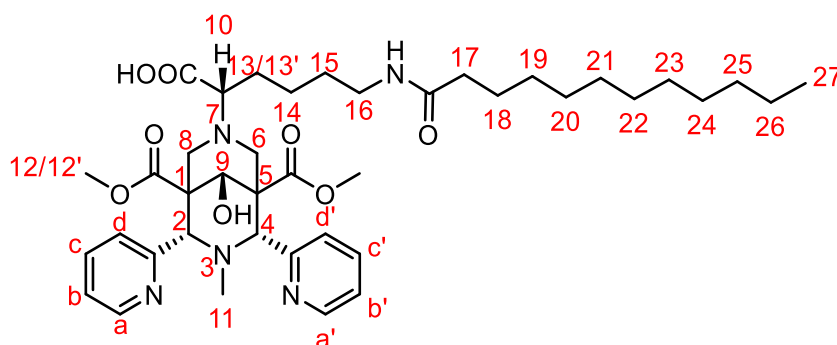
L₁ (70 mg, 0.13 mmol, 1 eq) is dissolved in H₂O (2.5 ml) and DMF (2 ml). PDITC (291 mg, 1.33 mmol, 10 eq) is then added to the solution and the mixture is stirred during 30 min. At the end, the excess of PDITC is filtered. H₂O is added to the solution and the observed precipitate is filtered. The solvent is then removed under vacuum at 35 °C to finally give

L₁₁.3NaOH.H₂O (77 mg) with a 69 % yield.

¹H NMR (D₂O, 400 MHz): δ 1.62 (m, 2H, H12); 1.79 (m, 2H, H13); 1.88 (s, 3H, H15); 2.00 (m, 1H, H11/H11'); 2.20 (m, 1H, H11/H11'); 3.17 (AB system, δ_A = 3.13, δ_B = 3.21, J_{AB} = 12.3 Hz, 2H, H6/H8); 3.56 (m, 4H, H10 + H14 + H8/H6); 3.81 (m, 1H, H6/H8); 4.28 (s, 1H, H9); 4.91 (m, 2H, H2 + H4); 7.23 (m, 2H, He/Hf), 7.31 (m, 2H, He/Hf); 7.43 (m, 2H, Hd/Hd'); 7.59 (m, 2H, Hb/Hb'); 7.86 (m, 2H, Hc/Hc'); 8.64 (m, 2H, Ha/Ha').

Mass Spectrometry: (ESI⁺/MS): m/z = 720.23 Da [M + H⁺], calculated for [C₃₄H₃₈N₇O₇S₂]⁺, 720.23 Da.

Elemental Analysis: Calculated for C₃₆H₄₁N₇O₇S₂.3NaOH.H₂O, C, 47.60, H, 4.93, N, 11.43, S, 7.48. Found: C, 47.89, H, 4.92, N, 11.61, S, 7.24.

Compound **22**

Chemical Formula: $C_{40}H_{59}N_5O_8$
Molecular Weight: 737.94

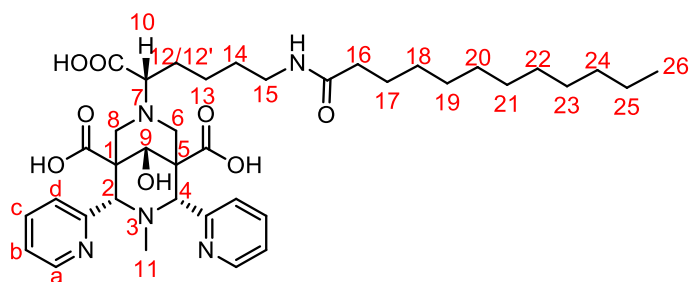
Oxalyl chloride (58 μ l, 0.68 mmol, 3 eq) is dissolved in a solution of dodecanoic acid (67 mg, 0.33 mmol, 1.5 eq) at 0 °C under argon. The mixture is stirred at room temperature for 3 hours. Then, the solvent is

distilled at the vacuum ramp fitted with a trap and the colourless oil is dissolved in a mixture of ACN (4 ml) and THF (4 ml). Compound **10** (150 mg, 0.22 mmol, 1 eq) and Et_3N (94 μ l, 0.67 mmol, 3 eq) are added to the mixture and the solution is stirred at room temperature for 16 hours. The solvent is then removed under vacuum and the crude product is purified by FPLC (C_{18} , 97/3 H_2O /ACN to 50/50 H_2O /ACN) to give **22** (140 mg) with a 86 % yield.

1H NMR (MeOD, 400 MHz) : δ 0.90 (t, J = 6.9 Hz, 3H, H27); 1.29 (m, 16H, H19-26); 1.63 (m, 4H, H14/H15 + H18); 1.74 (m, 2H, H14/H15); 1.89 (m, 1H, H13/13'); 2.21 (t, J = 7.4 Hz, 2H, H17); 2.31 (m, 4H, H13/13' + H11); 3.13 (m, 3H, H6/H8); 3.29 (m, 2H, H16); 3.39 (dd, J_1 = 10.0 Hz, J_2 = 4.5 Hz, 1H, H10); 3.57 (m, 1H, H6/8); 3.70 (s, 3H, H12/12'); 3.74 (s, 3H, H12/12'); 4.41 (s, 1H, H9); 5.63 (s, 1H, H2/4); 5.64 (s, 1H, H2/4); 7.53 (m, 2H, Hb/b'); 7.77 (m, 2H, Hd/d'); 7.95 (td, J_1 = 7.8 Hz, J_2 = 1.8 Hz, 2H, Hc/c'); 8.79 (m, 2H, Ha/a').

^{13}C NMR (MeOD, 126 MHz): δ 13.08; 22.34; 24.03; 25.77; 28.56; 28.95; 29.07(2 CH_2); 29.22; 29.27; 29.34 (2 CH_2); 31.76; 35.84; 38.88; 41.92; 48.87; 51.84; 51.88; 51.95; 52.32; 54.63; 65.74; 66.28; 66.93; 72.58; 124.71; 124.76; 127.28; 127.61; 137.51; 137.63; 149.11; 149.64; 151.51; 151.63; 166.94; 169.08; 172.32; 174.96.

Mass Spectrometry: (ESI⁺/MS): m/z = 738.43 Da [$M + H$]⁺, calculated for [$C_{40}H_{60}N_5O_8$]⁺: 738.44 Da.

Ligand **L12**

Chemical Formula: $C_{38}H_{55}N_5O_8$
 Molecular Weight: 709.89

Lithium hydroxide (23 mg, 0.95 mmol, 5.3 eq) is dissolved in a solution of **22** (140 mg, 0.18 mmol, 1 eq) in THF (6 ml) and H_2O (14 ml). The mixture is stirred at room temperature for 2 days. At the end, the solvent is removed under vacuum, the crude product is dissolved in a minimum of water and the pH is lowered to 2. The solution is purified by FPLC (C_{18} , 97/3 H_2O/ACN to 100 % ACN) to give **L12**.2.5LiCl (48 mg) with a 28 % yield.

1H NMR (MeOD, 400 MHz) : δ 0.9 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H26); 1.29 (m, 16H, H18-25); 1.63 (m, 4H, H13/H14 + H17); 1.74 (m, 2H, H13/H14); 1.89 (m, 1H, H12/12'); 2.21 (m, 2H, H16); 2.31 (m, 4H, H12/12' + H11); 3.11 (m, 3H, H6/H8); 3.30 (m, 2H, H15); 3.36 (m, 1H, H10); 3.57 (m, 1H, H6/8); 4.43 (s, 1H, H9); 5.58 (s, 1H, H2/4); 5.59 (s, 1H, H2/4); 7.53 (m, 2H, Hb); 7.77 (m, 2H, Hd); 7.95 (td, $J_1 = 7.8$ Hz, $J_2 = 1.8$ Hz, 2H, Hc); 8.79 (m, 2H, Ha).

Mass Spectrometry: (ESI⁺/HRMS): $m/z = 710.4113$ Da $[M + H]^+$, calculated for $[C_{38}H_{56}N_5O_8]^+$: 710.41 Da.

Elemental Analysis: Calculated for $C_{38}H_{55}N_5O_8 \cdot 2.5(LiCl)$, C, 55.94, H, 6.79, N, 8.58. Found: C, 56.38, H, 6.71, N, 8.17.

References

- (1) Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J. Org. Chem.* **1997**, *62* (21), 7512–7515. <https://doi.org/10.1021/jo971176v>.
- (2) Corsi, D. M.; Platas-Iglesias, C.; Bekkum, H. van; Peters, J. A. Determination of Paramagnetic Lanthanide(III) Concentrations from Bulk Magnetic Susceptibility Shifts in NMR Spectra. *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39* (11), 723–726. <https://doi.org/10.1002/mrc.922>.
- (3) Martell, A. E.; Motekaitis, R. J. *Determination and Use of Stability Constants*; Wiley-VCH: New York, 1992.
- (4) Gans, P. GLEE, a New Computer Program for Glass Electrode Calibration. *Talanta* **2000**, *51* (1), 33–37. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(99\)00245-3](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(99)00245-3).
- (5) P. Gans and B. O’Sullivan, GLEE© 3.0.15, Protonic Softwares 2005, Leeds, U.K. and Berkeley, CA.
- (6) Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. Investigation of Equilibria in Solution. Determination of Equilibrium Constants with the HYPERQUAD Suite of Programs. *Talanta* **1996**, *43* (10), 1739–1753. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(96\)01958-3](https://doi.org/10.1016/0039-9140(96)01958-3).
- (7) Raiford, D. S.; Fisk, C. L.; Becker, E. D. Calibration of Methanol and Ethylene Glycol Nuclear Magnetic Resonance Thermometers. *Anal. Chem.* **1979**, *51* (12), 2050–2051. <https://doi.org/10.1021/ac50048a040>.
- (8) Hugi, A. D.; Helm, L.; Merbach, A. E. Water Exchange on Hexaaquavanadium(III): a Variable-Temperature and Variable-Pressure ^{17}O -NMR Study at 1.4 and 4.7 Tesla. *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68* (2), 508–521. <https://doi.org/10.1002/hlca.19850680224>.
- (9) Drahoš, B.; Kotek, J.; Hermann, P.; Lukeš, I.; Tóth, É. Mn^{2+} Complexes with Pyridine-Containing 15-Membered Macrocycles: Thermodynamic, Kinetic, Crystallographic, and $^1\text{H}/^{17}\text{O}$ Relaxation Studies. *Inorg. Chem.* **2010**, *49* (7), 3224–3238. <https://doi.org/10.1021/ic9020756>.
- (10) Meiboom, S.; Gill, D. Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times. *Review of Scientific Instruments* **1958**, *29* (8), 688–691. <https://doi.org/10.1063/1.1716296>.
- (11) Micskei, K.; Helm, L.; Brucher, E.; Merbach, A. E. Oxygen-17 NMR Study of Water Exchange on Gadolinium Polyaminopolyacetates $[\text{Gd}(\text{DTPA})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2-}$ and $[\text{Gd}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$ Related to NMR Imaging. *Inorg. Chem.* **1993**, *32* (18), 3844–3850. <https://doi.org/10.1021/ic00070a013>.
- (12) Tóth, E.; Helm, L.; Merbach, A. Relaxivity of Gadolinium(III) Complexes: Theory and Mechanism. In *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*; Merbach, A., Helm, L., Tóth, É., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2013; pp 25–81. <https://doi.org/10.1002/9781118503652.ch2>.
- (13) Vaudon, J.; Frealle, L.; Audiger, G.; Dutilly, E.; Gervais, M.; Sursin, E.; Ruggeri, C.; Duval, F.; Bouchetou, M.-L.; Bombard, A.; Da Silva, I. First Steps at the Cyclotron of Orléans in the Radiochemistry of Radiometals: ^{52}Mn and ^{165}Er . *Rev. Sci. Instrum.* **2018**, *2* (3), 15. <https://doi.org/10.3390/instruments2030015>.

- (14) Legdali, T.; Roux, A.; Platas-Iglesias, C.; Camerel, F.; Nonat, A. M.; Charbonnière, L. J. Substitution-Assisted Stereochemical Control of Bispidone-Based Ligands. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (24), 11167–11176. <https://doi.org/10.1021/jo302248c>.
- (15) Comba, P.; Jermilova, U.; Orvig, C.; Patrick, B. O.; Ramogida, C. F.; Rück, K.; Schneider, C.; Starke, M. Octadentate Picolinic Acid-Based Bispidine Ligand for Radiometal Ions. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23* (63), 15945–15956. <https://doi.org/10.1002/chem.201702284>.
- (16) Roux, A.; Gillet, R.; Huclier-Markai, S.; Ehret-Sabatier, L.; Charbonnière, L. J.; Nonat, A. M. Bifunctional Bispidine Derivatives for Copper-64 Labelling and Positron Emission Tomography. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15* (6), 1475–1483. <https://doi.org/10.1039/C6OB02712A>.
- (17) Kolanowski, J. L.; Jeanneau, E.; Steinhoff, R.; Hasserodt, J. Bispidine Platform Grants Full Control over Magnetic State of Ferrous Chelates in Water. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19* (27), 8839–8849. <https://doi.org/10.1002/chem.201300604>.
- (18) Comba, P.; Grimm, L.; Orvig, C.; Rück, K.; Wadepohl, H. Synthesis and Coordination Chemistry of Hexadentate Picolinic Acid Based Bispidine Ligands. *Inorg. Chem.* **2016**, *55* (24), 12531–12543. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b01787>.
- (19) Roux, A.; Nonat, A. M.; Brandel, J.; Hubscher-Bruder, V.; Charbonnière, L. J. Kinetically Inert Bispidol-Based Cu(II) Chelate for Potential Application to ^{64/67} Cu Nuclear Medicine and Diagnosis. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (9), 4431–4444. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b00207>.
- (20) Salaam, J.; Tabti, L.; Bahamyirou, S.; Lecointre, A.; Hernandez Alba, O.; Jeannin, O.; Camerel, F.; Cianférani, S.; Bentouhami, E.; Nonat, A. M.; Charbonnière, L. J. Formation of Mono- and Polynuclear Luminescent Lanthanide Complexes Based on the Coordination of Preorganized Phosphonated Pyridines. *Inorg. Chem.* **2018**, *57* (10), 6095–6106. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b00666>.

Abréviation

1,4-DO2A	1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4-diacetic acid
1,7-DO2A	1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,7-diacetic acid
2-PPA	2-PhénylPropionAaldéhyde
2S	Second Sphere
9ane-N ₂ O-2A	1-oxa-4,7-diazacyclononane-4,7-diacetic acid
9ane-N ₂ O-2P	1-oxa-4,7-diazacyclononane-4,7-bis(methylenephosphonic acid)
9ane-N ₂ O-2P ^H	1-oxa-4,7-diazacyclononane-4,7-bis(methylenephosphinic acid)
9ane-N ₂ O-2P ^{Ph}	1-oxa-4,7-diazacyclononane-4,7-bis[methylene(phenyl)phosphinic acid]
AAZTA	1,4-bis (carboxymethyl)-6-[bis (carboxymethyl)]amino-6-[pentanoic-acid]perhydro-1,4-diazepine
ACN	ACétoNitrile
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
BODIPY	Bore-DIPYrrométhene
BOM	BenzylOxyMethyl
BOPTA	3,6,9-triaza-12-oxa-3,6,9-tricarboxymethylene-10-carboxy-13-phenyltridecanoic acid
CB-TE2A	2,2'-(1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecane-4,11-diyl)diacetic acid
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CDTA	trans-1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
COSY	COrrrelation SpectroscopY
DBCO	DiBenzoCyclOoctyne
DCB	1,2-DiChloroBenzene
DCC	DiCyclohexylCarbodiimide
DCM	Dichlrométhane
DFG	Débit de Filtration Glomérulaire
DFO	DesFerriOxamine
DFT	Density Functional Theory
DIPEA	N,N-DiisoPropylEthylAmine
DMAP	4-DiMéthylAminoPyridine
DMB	DiMétoxyBenzylamine
DMF	DiMéthylFormamide
DMP	DiMéthylPipérazine
DO1A	1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-acetic acid
DO3A	1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetic acid
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid
DOTP	1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraphosphonic acid
dpama	6,6'-((methylazanediy)bis(methylene))dipicolinic acid
DPDP	N,N'-dipyridoxylethylenediamine-N,N'-diacetate-5,5'-bis(phosphate)
DTPA	DiethyleneTriamine PentaAcetic Acid
DTPA -BMA	1,7-Bis(methylcarbamoylmethyl)-1,4,7-triazaheptane-1,4,7-triacetic acid
EDTA	EthyleneDiamineTetraacetic Acid
EOB	EthOxyBenzyl
ES	ElectroSpray
ESI	ElectroSpray Ionization
FDG	FluoroDésoxyGlucose
FPLC	Flash Purification Liquid Chromatography

FSN	Fibrose Systémique Néphrogénique
GCP	Gradient de Codage de Phase
GFC	Gradient de Codage de Fréquence
GSC	Gradient de Sélection de Coupe
HBET	N-(2-hydroxybenzyl)-N,N',N'-ethylenediaminetriacetic acid
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid
HP-DO3A	2,2',2''-[10-(2-hydroxypropyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl]triacetic acid
HSA	Human Serum Albumine
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Sequence
ICP	Inductive Coupled Plasma
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
IS	Inner Sphere
KHP	Hydrogénophosphate de potassium
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MES	Acide 2-éthanosulfonique
MS	Mass Spectroscopy
NC	Nombre de Coordination
NHS	N-HydroxySuccinimide
NMM	N-MéthylMorpholine
NMP	N-MéthylPipérazine
NMRD	Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion
NODAGA	2,2'-(7-(4-((2-aminoethyl)amino)-1-carboxy-4-oxobutyl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl)diacetic acid
NOESY	Nuclear OverHauser Effect Spectroscopy
NOTA	2,2',2''-(1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triyl)triacetic acid
OS	Outer Sphere
PC2A-EA	2,2'-(6-(2-aminoethyl)-3,6,9,15-tetraaza-bicyclo[9.3.1]pentadeca-1(14),11(15),12-triene-3,9-diyl)diacetic acid
PCMA	3,6,9,15-Tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-triene-6-acetic acid
PCMP	3,6,9,15-Tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-triene-6-phosphonic acid
PCTA	3,6,9,15-Tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-triene-3,6,9-triacetic acid
PDITC	p-Phénylène DiisoThioCyanate
PDT	PhotoDynamique Therapy
PyC3A	N-picolyl-N,N',N'-trans-1,2-cyclohexylenediaminetriacetic acid
RIT	RadioImmunoThérapie
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RR	Rendement de Radiomarquage
SBM	Solomon-Bloembergen-Morgan
SOD	SuperOxideDismutase
SPIO	Small Paramagnetic Iron Oxide
SPION	SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles
TCM	TriChloroMéthane
TDM	TomoDensitoMétrie
TEMP	Tomographie à Emission MonoPhotonique
TEP	Tomographie à Emission de Positrons
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane

TLC	Thin Layer Chromatography
TOF	Time Of Flight
USPIO	Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide
ZFS	Zero Field Splitting

Liste des présentations

Communications orales:

- *Synthesis of bispidine ligands for manganese (II) complexation and their application to PET/MR imaging.*
Maryame Sy, Daouda Ndiaye, Agnès Pallier, Sandra Mème, Isidro de Silva, Sara Lacerda, Aline M. Nonat, Loïc J. Charbonnière, Eva Tóth. IMBG (Institut des Métaux en Biologie Grenoble) : Metal Complexes in Biology: Imaging and Detection, 23-27 septembre 2019. Villard-de-Lans.
- *Synthesis of bispidine ligands for manganese (II) complexation and their application to PET/MR imaging.*
Maryame Sy, Daouda Ndiaye, Agnès Pallier, Sandra Mème, Isidro de Silva, Sara Lacerda, Aline M. Nonat, Loïc J. Charbonnière, and Eva Tóth. ACS Spring 2021, 4 septembre 2021(Web-Symposium).

Communication par affiche :

- *Synthesis of bispidine-type ligands for manganese(II) complexation and their application to PET/MRI.*
Maryame Sy, Aline Nonat, Daouda Ndiaye, Loïc Charbonnière, Eva Jakab Toth. GDR Agent d'Imagerie Moléculaire, 20-22 mai 2019. Dijon.

Liste des publications

Ndiaye, D.; Sy, M.; Pallier, A.; Mème, S.; Silva, I.; Lacerda, S.; Nonat, A. M.; Charbonnière, L. J.; Tóth, É. Unprecedented Kinetic Inertness for a Mn²⁺-Bispidine Chelate: A Novel Structural Entry for Mn²⁺-Based Imaging Agents. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 11958-11953.

Nonat, A. M.; Roux, A.; Sy, M.; Charbonnière, L. J. 2,4-Substituted Bispidines as Rigid Hosts for Versatile Applications: From κ -Opioid Receptor to Metal Coordination. *Dalton Trans.* **2019**, 48 (44), 16476–16492.

A Journal of the German Chemical Society

Angewandte

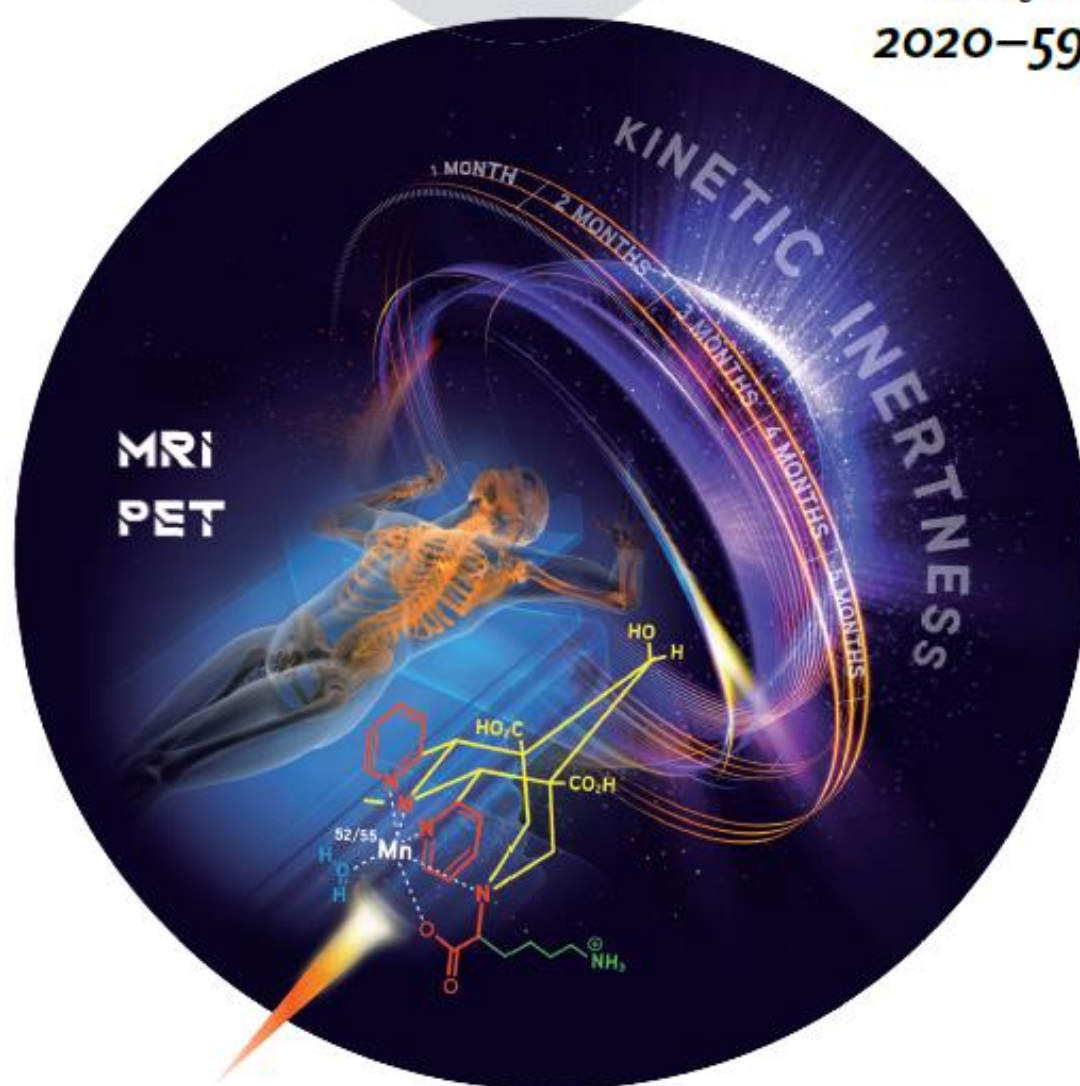
GDCh

International Edition

Chemie

www.angewandte.org

2020–59/29



Mn²⁺ complexes ...

... are more biocompatible alternatives to Gd³⁺-based MRI agents, and ⁵²Mn is an emerging radionuclide for positron emission tomography. Both applications require highly inert chelates, which, given the labile nature of Mn²⁺, remains a challenge. In their Research Article on page 11958, L. J. Charbonnière, É. Tóth, and co-workers demonstrate that a strongly preorganized 2,4-pyridyl-disubstituted bispidol ligand provides exceptional kinetic inertness to its Mn²⁺ complex.

WILEY-VCH

Synthèse de ligands de type bispidine pour la complexation du manganèse(II) et leurs applications à l'imagerie

Résumé

Ce travail de thèse porte sur la synthèse de ligands de type bispidine pour la complexation du manganèse(II) et leurs applications à l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la tomographie à émission de positrons (TEP). L'ion manganèse(II) est hautement paramagnétique, possède un long temps de relaxation longitudinale électronique et sa cinétique d'échange avec les molécules d'eau est rapide. Ces paramètres sont indispensables pour l'IRM. De plus, le manganèse existe aussi sous la forme du manganèse 52, un isotope radioactif émetteur de positrons, utilisable en TEP.

Les ligands de type bispidine sont une famille de composés idéaux pour la complexation des métaux. D'une part leurs structures « en cage » rigides et préorganisées sont favorables à la formation de complexes très stables et d'autre part leur sélectivité pour un métal donné peut être modulée en fonction des substituants.

L'objectif a donc été de synthétiser et de caractériser des ligands de type bispidine et d'étudier la stabilité thermodynamique, l'inertie cinétique et la relaxométrie des complexes de manganèse(II). Ces travaux ont montré que bien que ces complexes aient une stabilité thermodynamique modeste, ces derniers se distinguent par des inerties cinétiques exceptionnelles et par de hautes relaxivités. Au vue de ces propriétés, le complexe le plus prometteur a fait l'objet d'études *in vivo* en IRM et en TEP.

Mots-clés : bispidine, manganèse, IRM, TEP, inertie cinétique.

Abstract

This PhD work report the synthesis of bispidine-type ligands for manganese(II) complexation and their applications to magnetic resonance imaging and positron emission tomography. Manganese(II) ion is highly paramagnetic, has a long electronic relaxation time and a fast water exchange kinetic. These parameters are essential for MRI. Manganese also exists as manganese 52 a positron emitting radionuclide well suited for PET.

Bispidine-type ligands are well adapted for metal complexation. Their cage-like structure are favourable for the formation of stable complexes and their selectivity for one metal can be modulated by changing the substituents.

The aim of this work was to synthesize and characterize bispidine-type ligands and study the thermodynamic stability, the kinetic inertness and the relaxometry of the manganese(II) complexes. The results show that despite a modest thermodynamic stability, these complexes evidenced unprecedented kinetic inertness and high relaxivities. The more promising complex has been used for *in vivo* study in MRI and PET.

Keywords: bispidine, manganese, MRI, PET, kinetic inertness.