

### Les bispidines et les ions métalliques : un mariage qui dure

**Résumé** Cet article décrit comment, au cours de ces dernières années, la chimie des bispidines, combinée à la chimie de coordination et à la radiochimie, a ouvert la voie à un nouveau domaine d'application des bispidines : l'imagerie médicale. Deux exemples d'applications sont présentés : l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la tomographie à émission de positrons (TEP). Pour chacune de ces deux techniques, un ion métallique (Gd, Mn pour l'IRM ou un radioisotope pour la TEP) joue le rôle principal de « reporter » car c'est lui qui est à l'origine du signal. Cependant, ces ions ne peuvent être utilisés dans leur forme libre et doivent être « encagés » (complexés) par des molécules organiques afin de former des adduits résistant à la dissociation *in vivo*. Grâce à leur squelette rigide et préorganisé, les bispidines sont de bons candidats pour la complexation des métaux.

**Mots-clés** Bispidine, agents d'imagerie, IRM, TEP, isotopes métalliques,  $^{nat/64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{nat/52}\text{Mn}$ , sondes bimodales.

**Abstract** **Bispidines and metal ions: a marriage made to last**  
This article describes how, in recent years, the chemistry of bispidines combined with coordination chemistry and radiochemistry has paved the way to a new field of application for bispidines: medical imaging. Examples of practical applications to magnetic resonance imaging (MRI) and positron emission tomography (PET) are presented. For each of these two techniques, a metal ion (Gd, Mn for MRI or a radioisotope for PET) plays the main role of "reporter" and induces the signal. However, such ions cannot be used in their free state and must be "encaged" (complexed) with organic molecules in order to form adducts resistant to *in vivo* dissociation. Thanks to their rigid and pre-organized skeleton, bispidines are good candidates for metal complexation.

**Keywords** Bispidine, imaging probes, MRI, PET, metallic isotopes,  $^{nat/64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{nat/52}\text{Mn}$ , bimodal probes.

La grande famille des bispidines est caractérisée par un squelette bicyclique issu de la fusion de deux pipéridines (figure 1). À l'issue de la synthèse, une fonction cétone est souvent présente en position 9 ; le terme bispidone est alors utilisé. Pour des applications biologiques, cette cétone est réduite en fonction alcool afin d'éviter l'ouverture du cycle et sa dégradation ; on obtient alors la forme bispidol.

Initialement explorée par Mannich dans les années 1930 [1] et étudiée pour leurs propriétés analgésiques et leur influence sur le rythme cardiaque, la chimie des bispidines a connu un renouveau dans les années 1990 suite à l'introduction de substituants en positions 2 et 4 et à l'investigation de leurs propriétés de coordination par les chercheurs Comba, Wadepohl, Pritzkow et Kerscher, à l'Université de Heidelberg en Allemagne [2]. Plus récemment, les bispidines, et plus particulièrement les bispidols, se sont illustrés par leurs propriétés uniques pour la complexation des métaux, notamment en vue d'applications pour l'imagerie médicale.

L'intérêt du squelette bispidol réside dans plusieurs aspects :  
- une diversité structurale facilement accessible en modulant les substituants introduits sur le squelette (substituants  $R^1$  à  $R^4$ , figure 1) ;

- une facilité à encager divers métaux du fait d'une bonne pré-organisation ;

- une très forte stabilité en milieu biologique des complexes formés, apportée par la rigidité du squelette.

Quelques exemples très récents sont présentés ici afin de faire découvrir aux lecteurs le potentiel émergent de cette famille de molécules.

#### Un squelette façonné à volonté

Un avantage non négligeable des bispidines est que ces structures sont accessibles en seulement deux étapes à partir de précurseurs simples et peu coûteux. La synthèse de ces ligands s'effectue selon une succession de deux doubles réactions de Mannich (figure 2).

Les rendements obtenus lors de cette synthèse sont largement dépendants des substituants  $R^1$ ,  $R^2$  et  $R^3$  et sont en général limités par l'étape de formation du deuxième cycle pour laquelle des rendements allant de 5 à 91 % ont été observés. La difficulté vient du contrôle de la stéréochimie. En effet, dès la première cyclisation, l'intermédiaire pipéridinone (ou pipéridone) peut être obtenu sous la forme de deux isomères de conformation (*cis* ou *trans*, figure 3) selon que les substituants Ar en positions 2 et 4 soient introduits en position axiale ou équatoriale. De plus, pour chacun de ces composés, un équilibre céto-énolique est également possible, conduisant à un possible mélange des quatre isomères suivants en solution : *cis*-énol, *cis*-cétone, *trans*-cétone et *trans*-énol (figure 3), la proportion relative de chacune de ces espèces dépendant des conditions expérimentales (solvant, température...) et de la nature des substituants Ar et  $R^1$ .

Le bicycle est ensuite formé lors d'une deuxième étape pour former une molécule de type bispidone qui peut adopter l'une des trois conformations suivantes : chaise-chaise, bateau-chaise ou chaise-bateau. La forme bateau-bateau n'est pas

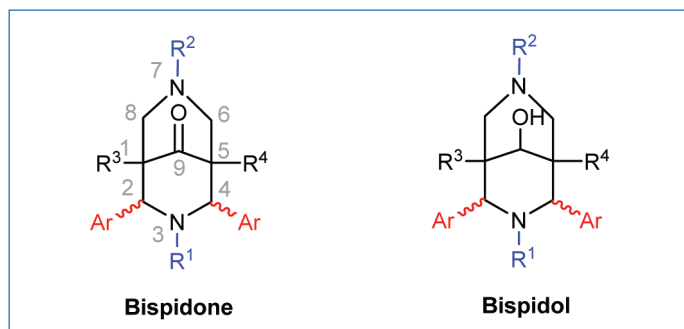


Figure 1 - Squelettes bispidone (avec numérotation selon l'IUPAC) et bispidol.

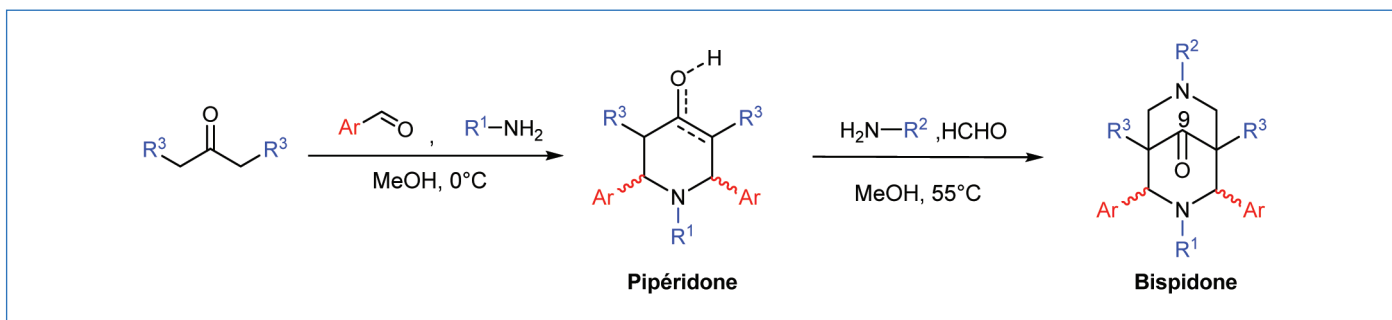


Figure 2 - Schéma de synthèse général du squelette bispidone impliquant l'intermédiaire pipéridone (appelé aussi pipéridinone) (adapté de [3]).

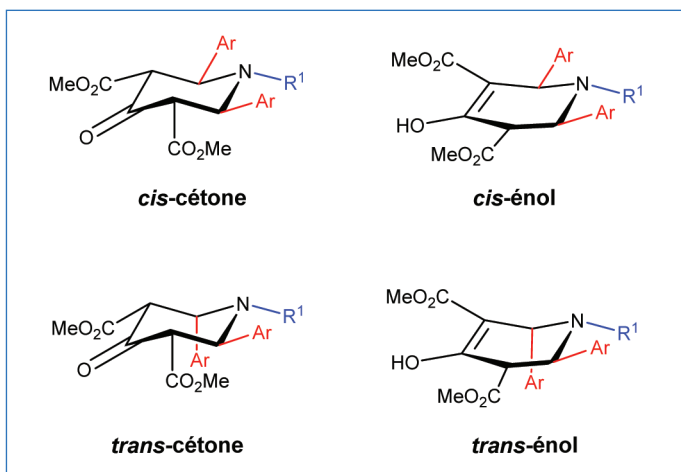


Figure 3 - Quatre isomères de l'intermédiaire pipéridone (adapté de [3]).

stable et n'est en général pas observée. À titre d'illustration, quelques structures de 2,4-diaryl bispidones sont représentées en figure 4.

Lorsqu'un groupement peu encombrant, de type proton ou méthyle, est introduit en position R<sup>1</sup>, les bispidones sont isolées dans la forme chaise-chaise pour laquelle les substituants aromatiques occupent la position équatoriale (figure 4a) [4]. Cette conformation est favorable à la complexation d'ions métalliques. À l'inverse, l'introduction d'un groupement encombrant en position R<sup>1</sup> favorise le basculement du cycle en position bateau afin d'obtenir une forme thermodynamiquement plus stable (figure 4b) [5]. De même, la conformation bateau est également observée lorsqu'il s'agit de minimiser la répulsion des deux doublets non liants des amines cycliques [6]. Enfin, l'introduction de gêne stérique au niveau de N3 [7] ou de groupements accepteurs de liaison hydrogène [8] peut également engendrer une configuration *trans* des substituants associée au basculement du cycle cyclohexanone en conformation bateau (figure 4d).

Les travaux développés actuellement au laboratoire se limitent à l'introduction d'un groupement pyridyl en positions 2 et 4. Pour les raisons mentionnées plus haut et dans le but de favoriser la complexation des cations métalliques, un substituant méthyle a tout d'abord été introduit en position R<sup>1</sup>. Néanmoins, il est tout à fait possible d'envisager l'introduction d'autres hétérocycles par la même voie de synthèse. Les bispidines non substituées en positions 2 et 4 sont quant à elles généralement obtenues par des synthèses plus complexes, la voie la plus simple faisant intervenir l'intermédiaire bis-benzylbispidine, obtenu en quatre étapes par la méthode récemment décrite par l'équipe de Gogoll [9].

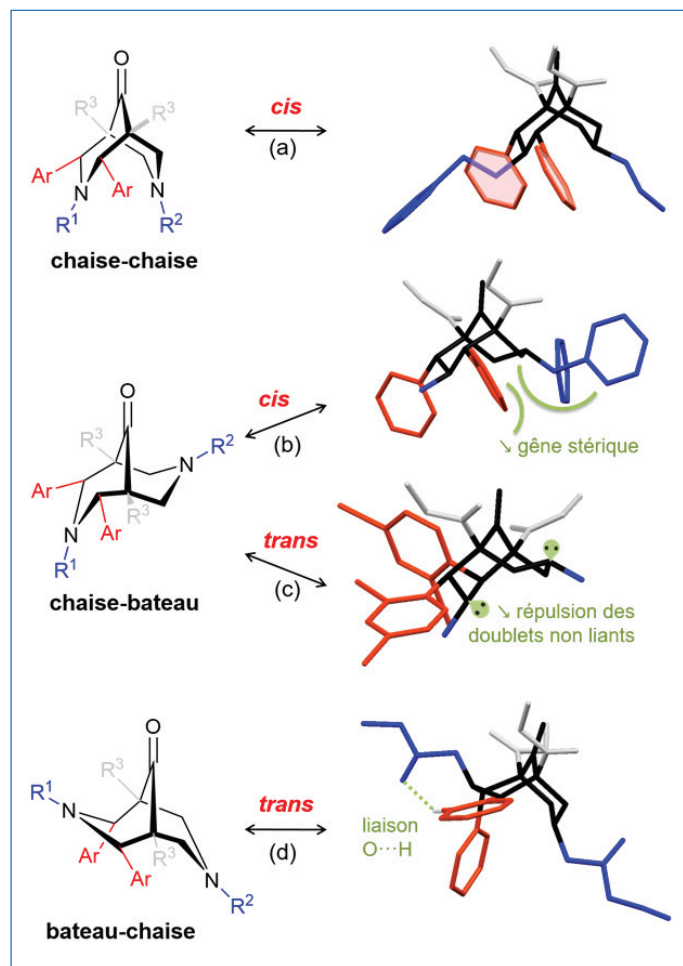


Figure 4 - Les différents isomères observés dans le cas de bispidones substituées en positions 2 et 4 à partir de structures cristallographiques (obtenues par diffraction des rayons X sur monocristaux) : a) *cis*-chaise-chaise (avec comme exemple Ar = phényle, R<sup>1</sup> = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Ph, R<sup>2</sup> = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH, R<sup>3</sup> = CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; b) *cis*-chaise-bateau (avec comme exemple Ar = phényle, R<sup>1</sup> = CH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> = 1,1-bis(2-pyridyl)éthane, R<sup>3</sup> = CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; c) *trans*-chaise-bateau (avec comme exemple Ar = 3,5-diméthylpyridine, R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = CH<sub>3</sub>, R<sup>3</sup> = CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; d) *trans*-bateau-chaise (avec comme exemple Ar = pyridine, R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Et, R<sup>3</sup> = CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) (adapté de [3]).

Dans notre cas, les bispidines cibles (figure 5) sont finalement obtenues à partir des bispidones correspondantes à la suite d'étapes de réduction de la cétone centrale puis de saponification des esters latéraux. Depuis les premiers travaux sur la bispidine L<sub>1</sub>, un travail d'optimisation de la sélectivité de la réduction a permis de contrôler la régiosélectivité (cétone *versus* ester) de la réaction ainsi que sa stéréosélectivité faciale, le groupement OH pointant systématiquement vers l'azote N3.

Dans un deuxième temps, une nouvelle voie de synthèse a été mise au point afin d'obtenir une plateforme versatile

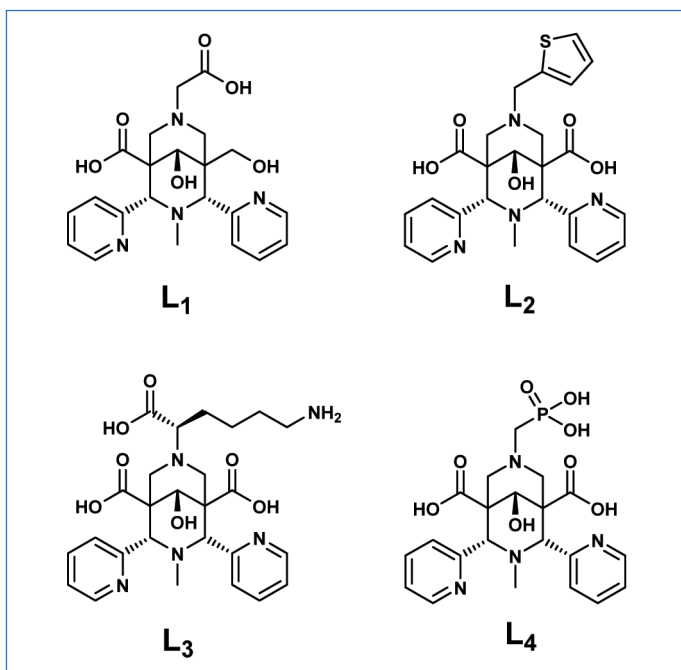


Figure 5 - Exemples de bispidols synthétisés dans l'équipe SynPA (IPHC, Strasbourg).

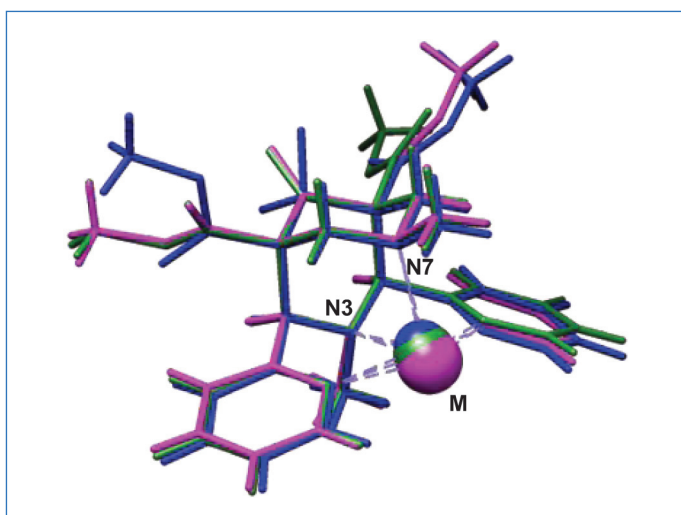


Figure 6 - Superposition des structures cristallographiques de complexes de Co(II) (en bleu), Mn(II) (en rose) et de Fe(II) (en vert) avec le ligand HZ2 ( $R^1 = R^2 = \text{CH}_3$ ) montrant la similitude de leurs structures (adapté de [3]).

en conformation chaise-chaise permettant d'introduire tous types de groupements aux positions  $R^1$ ,  $R^2$  et  $R^3$  par des réactions classiques de substitution nucléophile. Ces travaux, dont les derniers résultats par notre équipe ne sont pas encore publiés, font échos à ceux de l'équipe de Hasserodt [10].

### Une molécule cage

Un des grands principes de la chimie de coordination consiste à moduler la structure et la géométrie d'un ligand pour correspondre au polyèdre de coordination du métal visé et à son nombre de coordination. La particularité des bispidines réside dans la rigidité du squelette qui impose une distance  $d(\text{N}3, \text{N}7)$  pratiquement constante. À titre d'exemple, la comparaison des structures des complexes de Co(II), Mn(II) et Fe(II) avec le ligand HZ2 ( $R^1 = R^2 = \text{CH}_3$ ) met en évidence la grande rigidité du squelette (figure 6). Néanmoins, malgré cette forte rigidité, des géométries de coordination très variées (*cis*-octaédrique,

pyramide à base carrée, pentagonale ou même heptacoordinées) peuvent être obtenues en fonction du métal et du nombre de coordination.

De plus, les propriétés physico-chimiques de ces complexes, et notamment celles qui régissent leur stabilité *in vivo*, peuvent être ajustées finement en fonction des substituants introduits aux positions Ar,  $R^1$  et  $R^2$ .

Nos études ont montré que les ligands pentadentates  $L_1$ ,  $L_3$  et  $L_4$  étaient de très bons ligands du Cu(II) [11-12]. À titre d'exemple, le ligand  $L_4$  permet de complexer le Cu(II) à de très faibles concentrations (nM), en l'absence d'excès de ligand, à température ambiante et dans une large gamme de pH (pH = 2 à pH = 12) (figure 7a). Des études de voltampérométrie cyclique (figure 7b) ont montré que le complexe de Cu(II) était extrêmement stable à la réduction : le potentiel d'oxydo-réduction du complexe  $[\text{Cu}^{\text{II}}L_4]$  est inférieur à celui du milieu biologique, ce qui suggère l'absence de réduction dans des conditions physiologiques. De plus, le processus  $\text{Cu}^{\text{II}}L_4 + e^- \rightleftharpoons \text{Cu}^{\text{I}}L_4$  est réversible, indiquant également une bonne stabilité de l'espèce réduite  $[\text{Cu}^{\text{I}}L_4]$  (figure 7b).

Enfin, il s'est révélé que le complexe  $[\text{Cu}L_4]$  était extrêmement stable en milieu très acide (plusieurs mois, 5M  $\text{HClO}_4$ ) [11], mettant en lumière la faible propension du complexe à se dissocier. On parle alors d'une excellente inertie cinétique. Ces données sont de bons indicateurs du potentiel de ce ligand pour des applications en médecine ou en biologie, nous encourageant à poursuivre dans cette voie.

### Un potentiel et des applications inédites en imagerie

Les propriétés de coordination des bispidines, et en particulier leur inertie cinétique exceptionnelle, sont particulièrement adaptées au cahier des charges imposé pour la mise au point de sondes moléculaires pour l'imagerie nucléaire. Nous étudions plus particulièrement l'application des complexes de bispidines pour la tomographie à émission de positrons (TEP) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

#### La tomographie par émission de positrons (TEP)

La TEP est une technique d'imagerie nucléaire permettant des études fonctionnelles et métaboliques grâce à l'utilisation d'un traceur radioactif, émetteur de particules  $\beta^+$  (positrons). Le signal, deux rayons  $\gamma$  de même direction mais de sens opposés, résulte de l'annihilation entre un positron et un électron (figure 8). Les principaux avantages de cette technique sont sa grande pénétration, sa très forte sensibilité et sa bonne résolution. Un autre avantage est que l'énergie des photons émis est identique (511 keV) quel que soit l'isotope émetteur de positron utilisé, ce qui permet l'utilisation d'un scanner TEP unique pour différents radioisotopes. La TEP est une technique moderne et n'a été introduite dans le milieu clinique qu'en 1976. Au début des années 2000, son couplage avec la tomodensitométrie, une technique radiographique, a été un véritable tremplin à son développement [13].

Le radioisotope le plus utilisé actuellement est le  $^{18}\text{F}$  ( $^{18}\text{F}$ -fluorodéoxyglucose,  $^{18}\text{F}$ -FDG), mais celui-ci présente un temps de demi-vie court ( $t_{1/2} = 1,8 \text{ h}$ ), ce qui restreint son utilisation à l'étude de processus biologiques rapides. Face à la généralisation du ciblage moléculaire et immunologique par des vecteurs biologiques ayant des pharmacocinétiques longues, il devient indispensable de se tourner vers de nouveaux complexes stables comportant des radiométaux

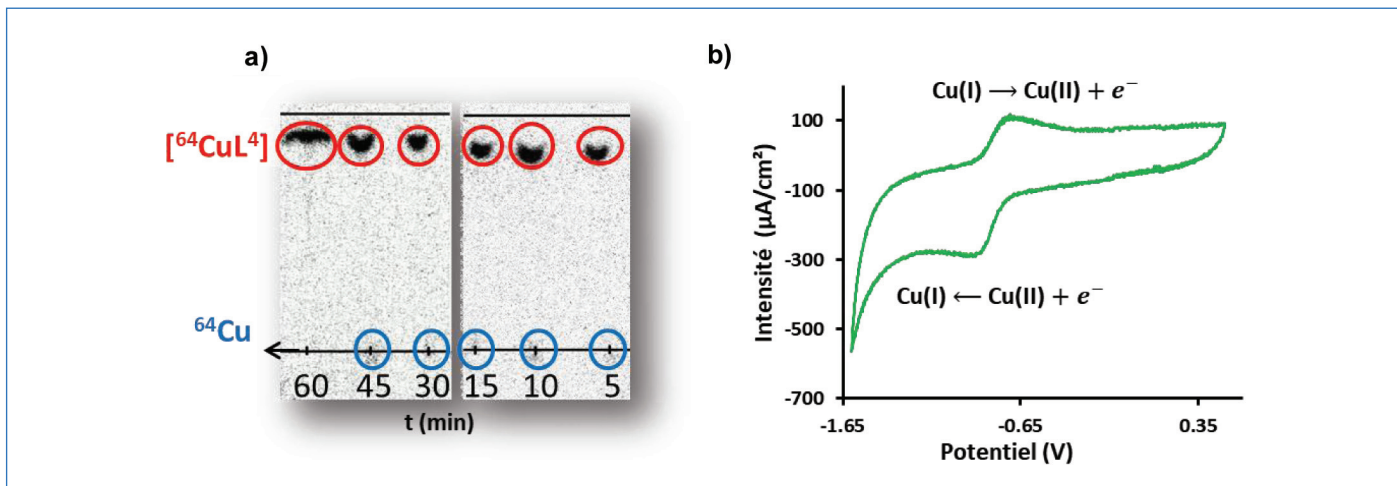


Figure 7 - a) En différenciant le Cu(II) libre (bleu) du complexe (rouge), la technique de radiochromatographie sur couche mince (silice, éluant  $\text{NH}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  1/2/1) permet de suivre la réaction de radiomarquage du ligand  $\text{L}_4$  avec le  $^{64}\text{Cu}$  dans différentes conditions (température, pH, ratio  $[\text{L}_4]/[\text{Cu}]$ ) à de très faibles concentrations (ici  $[\text{Cu}^{II}] = 4 \text{ nM}$ ). b) La voltampérométrie cyclique consiste à appliquer une différence de potentiel (E) dans une solution et à mesurer les variations d'intensité du courant (i) de cette solution, qui dépendent des espèces présentes. Ici, on en déduit le potentiel d'oxydoréduction du couple Cu(II)/Cu(I).

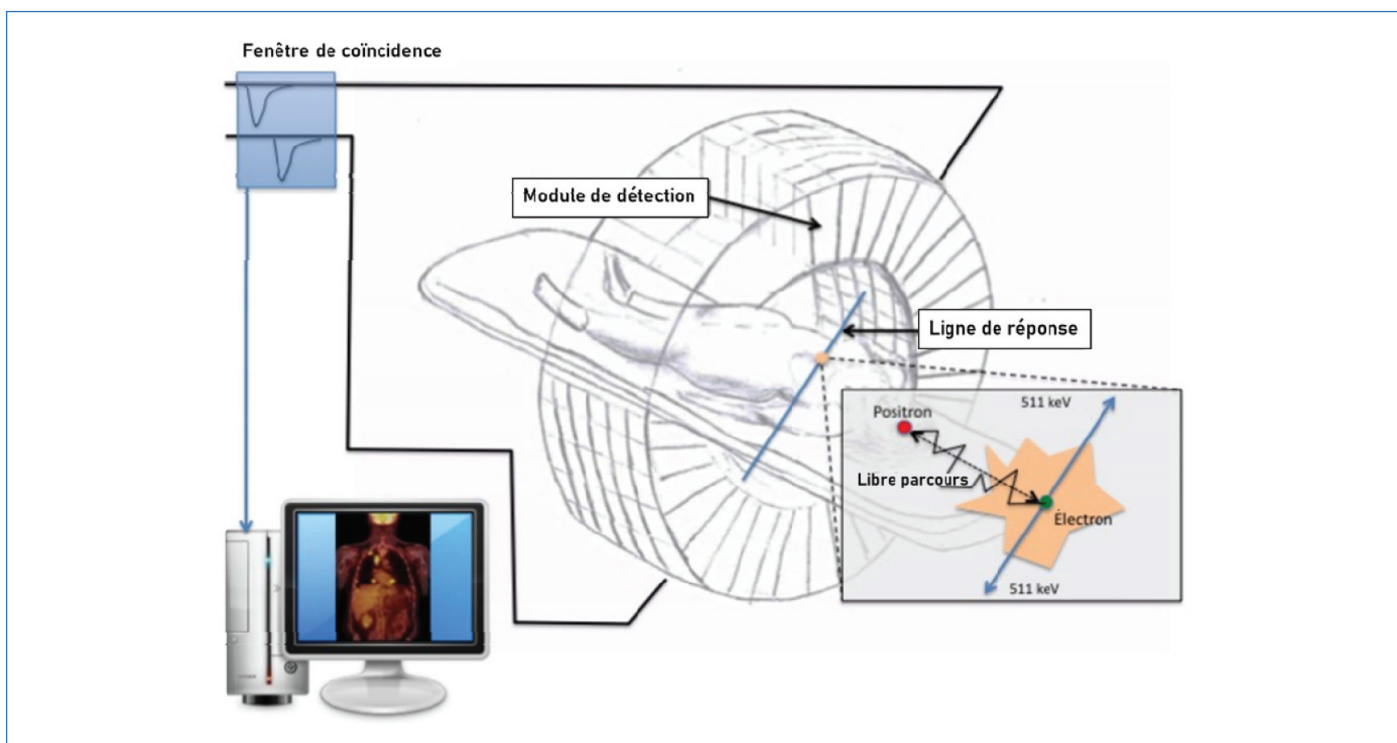


Figure 8 - Schéma de principe de la tomographie à émission de positrons (TEP) montrant l'émission de deux photons gamma lors de l'annihilation d'un positron avec un électron et leur détection par les scintillateurs du module de détection. La reconstruction de l'image est obtenue par le calcul du lieu des événements coïncidents (adapté de [14]).

avec des temps de demi-vie adaptés. Dans ce cadre, nous nous sommes particulièrement intéressés au  $^{64}\text{Cu}$ , au  $^{68}\text{Ga}$  et au  $^{52}\text{Mn}$ . Le  $^{64}\text{Cu}$  ( $\beta^+$ , 17,8 %, 653 keV,  $t_{1/2} = 12,9 \text{ h}$ ) possède un temps de demi-vie intermédiaire qui est en adéquation avec le temps de circulation des biomolécules ayant un poids moléculaire moyen (entre 20 et 150 kDa) telles que les peptides et les fragments d'anticorps.

Le  $^{68}\text{Ga}$  a une durée de demi-vie comparable à celle du  $^{18}\text{F}$  ( $\beta^+$ ,  $t_{1/2} = 1,0 \text{ h}$ ). Cependant, il peut être produit à partir d'un générateur ( $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ ), ce qui est très pratique en l'absence de cyclotron à proximité. C'est donc de ce point de vue une très bonne alternative au  $^{18}\text{F}$ .

Le  $^{52}\text{Mn}$  est un agent double car il a la particularité d'être détecté à la fois en TEP (dans le cas du  $^{52}\text{Mn}$  radioactif) et en

IRM (en utilisant l'isotope naturel  $^{55}\text{Mn}$ ) ; c'est même l'unique métal permettant cette dualité de détection. Sa demi-vie très longue ( $\beta^+$ ,  $t_{1/2} = 5,6 \text{ j}$ ) est adaptée à l'imagerie de processus biologiques lents. Malgré ces nombreux avantages, le  $^{52}\text{Mn}$  est un radionucléide émergent et son utilisation reste limitée par sa faible disponibilité, pour des questions de radioprotection et par le manque de ligands adéquats.

Quel que soit le radioisotope métallique considéré, il est utilisé sous la forme d'un complexe de coordination. Le ligand doit alors répondre aux trois critères suivants :

- permettre la complexation rapide du radionucléide dans des conditions très compétitives (solutions aqueuses diluées de l'ordre du pM au nM, pH physiologique et température ambiante) ;

- former des complexes stables *in vivo* ;
- avoir une fonction chimique réactive pour le couplage avec des vecteurs assurant le ciblage biologique.

Les deux premiers critères peuvent sembler contradictoires et l'inertie cinétique est un critère déterminant. Plusieurs ligands macrocycliques rigides sont connus pour former des complexes très stables d'un point de vue thermodynamique et cinétique au dépend d'une formation lente et impossible à température ambiante, ce qui peut être prohibitif pour l'utilisation de vecteurs de ciblage thermosensibles tels que les anticorps. En revanche, les ligands linéaires ou podants présentent généralement une complexation rapide à température ambiante mais souffrent de faibles stabilités cinétiques. Seule une poignée de complexes peut répondre simultanément aux deux critères, les dérivés de bispidine en faisant partie [3-4].

### L'imagerie par résonance magnétique (IRM)

L'IRM est basée sur l'observation de la résonance magnétique nucléaire (RMN) des protons dans l'organisme suite à leur excitation par une séquence de pulses radiofréquences. Au contraire de la TEP, c'est une technique ancienne qui date des années 1970, les premières images chez l'homme ayant été effectuées en 1979. Les agents de contraste sont des molécules ou des nanoparticules qui permettent d'accentuer le contraste en accélérant la vitesse de relaxation des spins nucléaires des molécules d'eau environnantes. En France, les agents de contraste commerciaux sont des complexes de gadolinium. Pour être efficaces, ces complexes doivent avoir au moins une molécule d'eau liée au centre métallique afin de permettre le transfert de l'effet de relaxation paramagnétique aux protons des molécules environnantes.

De manière similaire aux radiotraceurs, la stabilité des complexes est primordiale. La dose injectée étant largement supérieure (on injecte classiquement 4 grammes d'agent de contraste à un patient), la toxicité est une question cruciale. Cette toxicité est principalement engendrée par la libération d'ions Gd(III) toxiques et est d'autant plus critique chez les patients insuffisants rénaux pour qui une pathologie de plus en plus fréquente, la fibrose systémique néphrogénique, provoque une rigidification des tissus (peau, poumons, cœur) et peut être fatale. Il est donc important de proposer des alternatives à ces complexes. Les complexes de manganèse sont une bonne alternative car ils permettent d'atteindre des efficacités similaires en termes de contraste et ont la particularité d'être plus biocompatibles. Cependant, leur utilisation reste limitée par le manque de ligands permettant de former des complexes très stables tout en incorporant une ou plusieurs molécules d'eau. Ici encore, la plateforme bispidine semble avoir un rôle à jouer.

### Complexation du $^{64}\text{Cu}$

Les études sur le complexe  $[\text{CuL}_4]$  ont initié des travaux de recherche en faveur de l'application de ce type de complexe pour l'imagerie TEP. En particulier, la grande inertie cinétique du complexe s'est confirmée en milieu sérique humain, ce qui a permis d'effectuer des images *in vivo* par  $\mu$ -TEP chez la souris, mettant en évidence une bonne élimination par les fonctions rénales et urinaires ainsi qu'une faible accumulation dans le foie (résultats non publiés). Ces propriétés ainsi que leur capacité à former un complexe radioactif à température ambiante font des bispidines de bons candidats pour le marquage de biomolécules thermosensibles comme les anticorps.

### Complexation du $^{68}\text{Ga}$

La chimie de complexation du Ga(III) est dominée par la formation d'hydroxocomplexes  $[\text{Ga}(\text{OH})_3]$  à pH physiologique ; il est donc difficile de trouver des ligands efficaces dans une large gamme de pH. Autre point critique, les complexes de Ga(III) sont sujets à des réactions de transchélation (par la transferrine en particulier) et de transmétallation (vis-à-vis du Cu(II), du Zn(II) et du Fe(III)), et il est donc de ce point de vue important de former des complexes cinétiquement inertes. Le ligand  $\text{L}_3$  a permis d'obtenir de bons rendements de radiomarquage (94 %,  $[\text{L}_3] = 200 \mu\text{M}$ , pH = 4, 95 °C) et qui devraient pouvoir être améliorés en ajustant les propriétés de coordination du ligand [15]. En effet, un mode de coordination hexadentate devrait permettre d'augmenter la stabilité thermodynamique des complexes ainsi que leur sélectivité. Néanmoins, le complexe  $[\text{GaL}_3]$  s'est révélé stable en milieu sérique (sérum de veau fœtal), ce qui a permis son utilisation comme agent d'imagerie TEP.

Aussi, le groupement (L)-lysine du ligand  $\text{L}_3$  permet d'accéder, par synthèse peptidique, à des chélates bifonctionnels [12]. Par exemple, l'amine libre peut former un lien peptidique avec des acides activés, de type ester-NHS, pour former les bioconjugués correspondants (figure 9).

En particulier, cette stratégie a été mise à profit pour coupler le ligand  $\text{L}_3$  à une porphyrine afin d'obtenir un agent dual pour le diagnostic (par TEP) et la thérapie (par thérapie photodynamique, TPD) (figure 10). On parle alors d'agents « théranostiques ». Sous irradiation lumineuse avec un laser, la porphyrine permet la formation d'oxygène singulet qui va entraîner la mort cellulaire. En couplant la thérapie avec une technique d'imagerie, il est possible de mesurer la distribution de l'agent thérapeutique en temps réel et d'ajuster le stimulus ; ainsi l'efficacité thérapeutique est davantage restreinte aux tissus malades et les effets secondaires sont moindres.

La cytotoxicité du conjugué  $\text{L}_5$  et du complexe marqué  $^{68}\text{GaL}_5$  a été évaluée sur des cellules d'adénocarcinome humain (HT-29), sous irradiation de lumière visible (400-700 nm, 20 J cm<sup>-2</sup>) et en absence de lumière. Alors qu'une très faible cytotoxicité est observée dans le noir, une phototoxicité élevée a été mesurée sous irradiation (> 90 % des cellules,  $^{68}\text{GaL}_5 = 50 \mu\text{M}$ ), similaire à celle de l'agent commercial porphyrique Photofrin®. Ces résultats démontrent que le duo bispidine/porphyrine permet d'accéder à des sondes théranostiques TEP/TPD stables et efficaces. Ces travaux se distinguent des travaux antérieurs basés sur des complexes de  $^{68}\text{Ga}$  et des porphyrines dans le sens où les systèmes précédents n'avaient permis d'obtenir ni un radiomarquage efficace du complexe en présence de la porphyrine, ni des complexes suffisamment stables [16-17].

### Complexation du $^{55/52}\text{Mn}$

Le Mn(II) est l'unique métal permettant à la fois l'IRM ( $^{55}\text{Mn}$ ) et la TEP ( $^{52}\text{Mn}$ ). L'isotope  $^{52}\text{Mn}$  a été produit pour la première fois en France, au cyclotron d'Orléans, il y a moins d'un an [18]. C'est toutefois un défi pour les chimistes de coordination de synthétiser des ligands qui permettent de former des complexes de Mn(II) stables tout en incorporant une molécule d'eau dans leur sphère de coordination, car les complexes de Mn(II) sont extrêmement labiles en milieu aqueux.

Avec ses cinq atomes donneurs et son squelette rigide et préorganisé, le ligand  $\text{L}_3$  apparaissait comme un candidat potentiel. Effectivement, la formation du complexe  $[\text{MnL}_3]$  a été confirmée par potentiométrie et la présence d'une

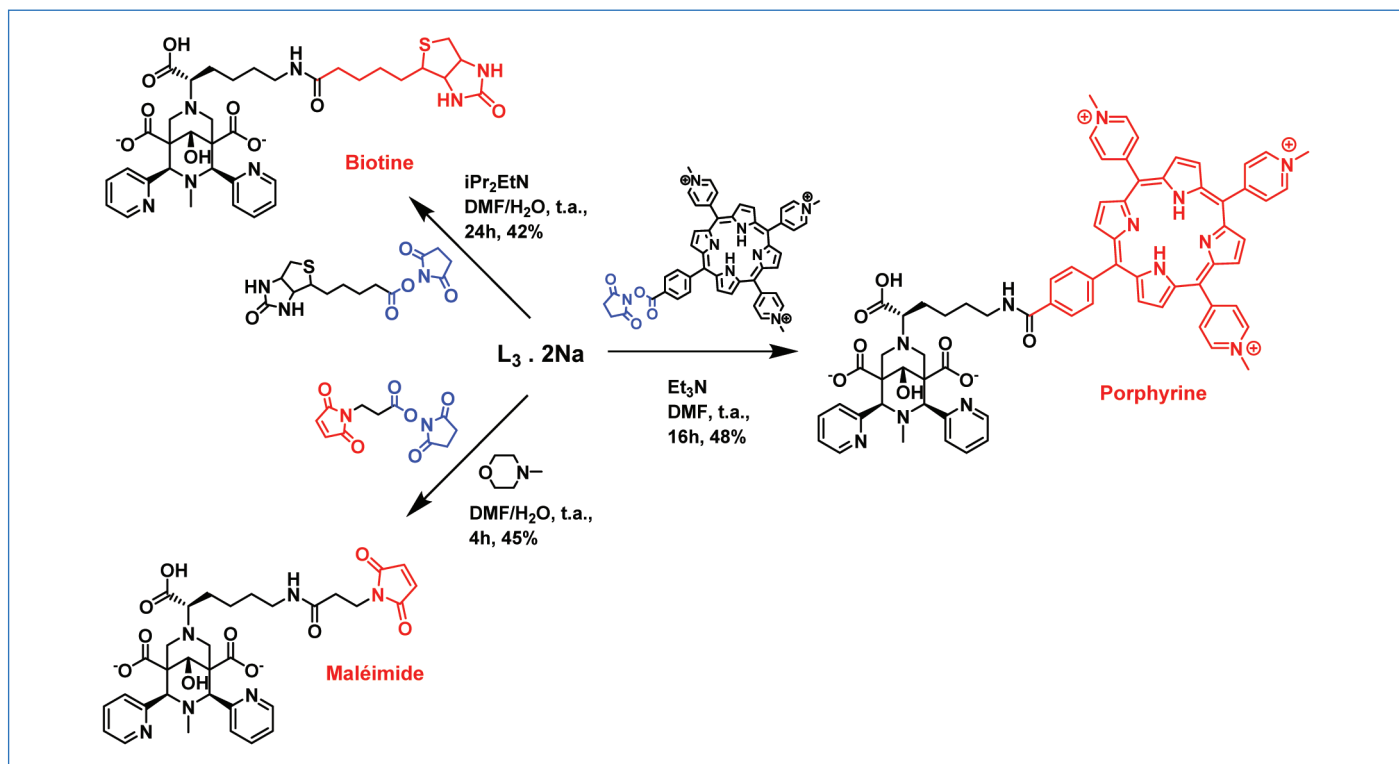


Figure 9 - Le ligand  $L_3$  permet d'accéder à une librairie d'adduits par le couplage d'esters activés de type NHS (en bleu) : la biotine est utilisée pour son interaction forte avec la streptavidine ; la fonction maléimide permet un couplage sélectif avec les fonctions thiols de peptides/anticorps ; les porphyrines sont utilisées pour la thérapie photodynamique (t.a. : température ambiante).

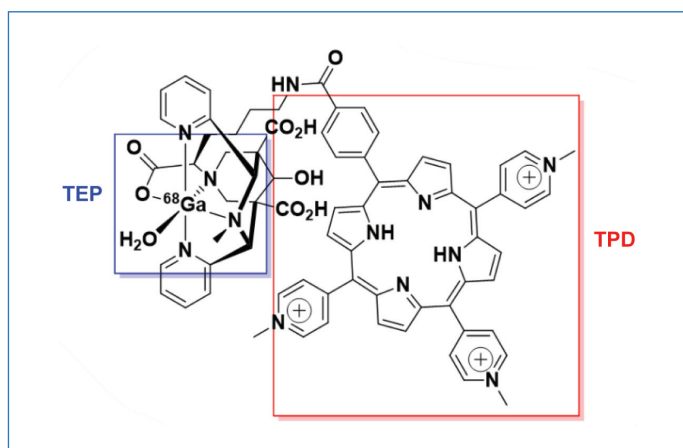


Figure 10 - Schéma de l'agent théranostique TEP/PDT  $^{68}\text{GaL}_5$  (d'après [15]).

molécule d'eau a été vérifiée par des études de RMN  $^{17}\text{O}$ . Si la stabilité thermodynamique du complexe reste modeste, il a été démontré qu'une fois formé, le complexe est très peu enclin à se dissocier. Une forte inertie cinétique a été mesurée en présence de compétiteurs variés (HCl 0,01-1,0 M, 10-50 équivalents de  $\text{Zn(II)}$ ), et une fois encore, c'est là le facteur déterminant pour une application en imagerie. L'efficacité du complexe  $[\text{MnL}_3(\text{H}_2\text{O})]$  en termes de contraste IRM a été déterminée par la mesure de la relaxivité. La relaxivité est définie comme étant la contribution à l'augmentation de la vitesse de relaxation des protons de l'eau apportée par une millimole d'ion paramagnétique par litre. Elle est mesurée à l'aide d'un relaxomètre et dépend du champ magnétique appliqué et de la température. Typiquement, la relaxivité du  $[\text{GdDOTA}(\text{H}_2\text{O})]$  (commercialisé sous Dotarem<sup>®</sup> et largement utilisé en clinique) est de  $4,2 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  (20 MHz, pH = 7,34, 25°C). Dans les mêmes conditions, une relaxivité très

similaire ( $4,28 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) a été déterminée pour le complexe  $[\text{MnL}_3(\text{H}_2\text{O})]$ . Cette valeur laisse présager une efficacité similaire au Dotarem<sup>®</sup>, d'autant que la relaxivité est conservée en milieu biologique. Ceci est très important et ce n'est pas toujours le cas car les protéines du sérum comme l'albumine, et certains anions comme le citrate, le carbonate ou les ions phosphate sont présents à des concentrations suffisantes dans le sang pour induire leur coordination à l'ion paramagnétique (Gd ou Mn) et chasser les molécules d'eau de sphère interne.

Le complexe  $[\text{MnL}_3(\text{H}_2\text{O})]$  a donc été injecté à des souris saines à des fins d'imagerie par IRM (figure 11). Les images ont montré que le contraste était maximal 4 minutes après l'injection. Ensuite, le complexe est rapidement éliminé par les reins et son accumulation dans le foie, les muscles et les os est limitée. Ces données ont été confirmées par quantification *ex vivo* de coupes tissulaires, en mesurant la quantité de manganèse par ICP (plasma par couplage inductif), de souris ayant reçu ou non une dose d'agent de contraste. Ces résultats sont très prometteurs et laissent présager une faible toxicité. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux propriétés de chélation du bispidol  $L_3$  avec l'isotope radioactif  $^{52}\text{Mn}$ . Les conditions de réaction ont été optimisées pour atteindre un radiomarquage quasi quantitatif (98 %, pH = 7, 70 °C, 1 h). La forte inertie cinétique du complexe a été confirmée *in vitro* en mesurant la stabilité du complexe dans différents milieux (eau, tampon phosphate, saumure, protéine sérique) sur une période de 24 h. Ces résultats très encourageants sont à confirmer avec de l'imagerie *in vivo* par  $\mu\text{-TEP}$ .

### Vers de nouveaux agents d'imagerie moléculaire

Le squelette bispidol, rigide et préorganisé, offre une grande versatilité pour la chélation de métaux. En particulier dans le

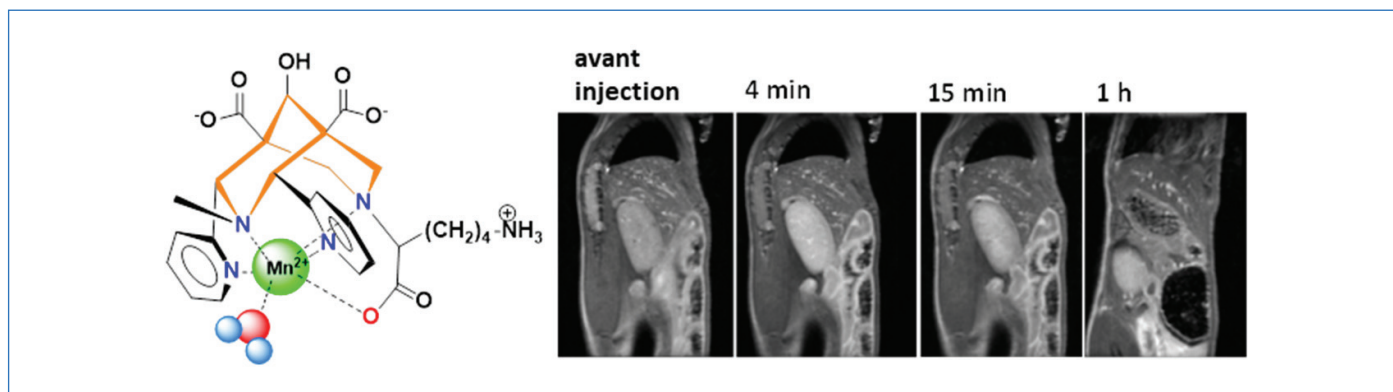


Figure 11 - Complexe  $[MnL_3(H_2O)]$  et coupes sagittales de souris obtenues par IRM à différents temps après injection intraveineuse de complexe ( $0,06 \text{ mmol kg}^{-1}$ ) (d'après [18]).

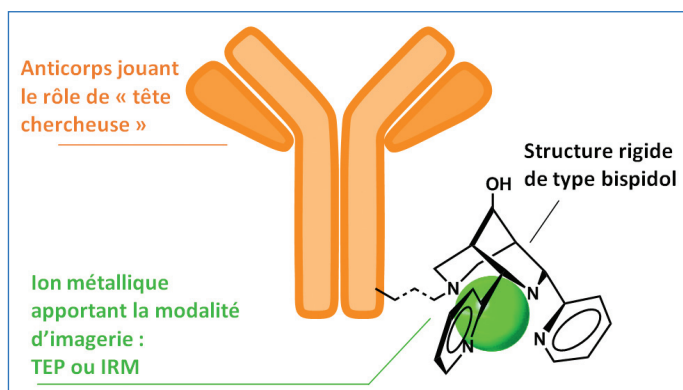


Figure 12 - Représentation schématique d'une sonde d'imagerie moléculaire associant un agent d'imagerie de type bispidine et une « tête chercheuse » (ici un anticorps) pour le ciblage biologique.

cas du Cu(II) et du Mn(II), les complexes formés se démarquent par leur très bonne inertie cinétique, ce qui permet d'envisager leur application en imagerie sans risque de toxicité. Ainsi, l'utilisation des bispidines a permis l'accès à des complexes de  $^{52}\text{Mn}$  radioactifs, une première en France, avec une stabilité inégalée. Avec l'aide de nos collaborateurs, les prochaines études seront orientées vers l'acquisition d'images par  $\mu\text{-TEP}$  au  $^{52}\text{Mn}$  et leur application à des pathologies spécifiques, en créant des sondes d'imagerie moléculaires.

Ces sondes moléculaires ont la particularité de reconnaître spécifiquement un motif biologique caractéristique de la pathologie ciblée. Dans le cas de l'IRM, elles peuvent également moduler leur réponse en fonction de leur environnement. Elles sont obtenues en associant une « tête chercheuse » (peptide, anticorps) au complexe métallique (figure 12). Ceci est facilement envisageable avec le squelette bispidine en utilisant la chimie développée dans le cas des ligands  $L_4$  par exemple [12].

De telles sondes sont de plus en plus utilisées en imagerie préclinique et théranostique. Elles permettent, entre autres, de développer une médecine personnalisée qui vise à imager en temps réel l'efficacité des agents thérapeutiques (PDT, chimiothérapie, immunothérapie...) afin de minimiser les doses et de diminuer les effets secondaires. Bien que très bénéfiques, on peut se douter que leur translation vers une application clinique prendra plus de temps, du fait des coûts associés ou se limitera à certaines pathologies complexes pour lesquelles l'imagerie des marqueurs moléculaires est indispensable à un diagnostic précoce (imagerie des corps de Lewy, maladie d'Alzheimer...).

Enfin, l'accès au couple  $^{52/55}\text{Mn}$  ouvre l'accès à toute une série d'applications centrées autour de l'imagerie bimodale TEP-IRM. Dans ce cas, l'association de deux techniques d'imagerie complémentaires permet de suppléer aux défauts de chaque technique individuelle et d'offrir un diagnostic de pointe en termes de sensibilité, de résolution spatiale et d'imagerie moléculaire. Plusieurs imageurs TEP-IRM sont déjà opérationnels en France et sont particulièrement utilisés pour les neurosciences, dans le suivi de la schizophrénie, des accidents vasculaires cérébraux (AVC), des tumeurs cérébrales ou encore des mécanismes de la vulnérabilité au stress [19].

*L'auteure remercie tous ses collègues, collaborateurs, doctorants et stagiaires qui travaillent à ses côtés sur cette thématique de recherche, en particulier Loïc Charbonnière (Équipe SynPA, IPHC), Ali Ouadi, David Brasse, Frédéric Boisson (cyclotron CYRCE, plateforme d'imagerie DHRIM, IPHC) avec qui ces projets se sont développés à Strasbourg depuis une dizaine d'années, ainsi que Graeme Stasiuk (Université de Hull, King's College de Londres) pour avoir ouvert le volet sur la chimie du  $^{68}\text{Ga}$ , et Éva Jakab Tóth, Sara Lacerda (Centre de Biophysique Moléculaire, Orléans) et Isidro de Silva (Institut des Conditions Extrêmes et Matériaux : Haute Température et Irradiation, Orléans) qui ont permis le tremplin vers la chimie du manganèse. Elle remercie également les institutions qui rendent ces travaux possibles (CNRS, IPHC, ANR, Université de Strasbourg). L'auteure remercie encore Loïc Charbonnière avec qui ce travail a été démarré fin 2010, pour ses conseils et sa relecture avisée, ainsi qu'Éva Jakab Tóth pour sa relecture constructive.*

- [1] C. Mannich, F. Veit, Über Derivate des Bispidins, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1935**, *68*, p. 506-512.
- [2] P. Comba, M. Kerscher, W. Schiek, Bispidine coordination chemistry, in *Progress in Inorganic Chemistry*, K.D. Karlin (ed.), John Wiley & Sons, **2007**, p. 613-704.
- [3] A.M. Nonat, A. Roux, M. Sy, L.J. Charbonnière, 2,4-substituted bispidines as rigid hosts for versatile applications: from  $\kappa$ -opioid receptor to metal coordination, *Dalton Trans.*, **2019**, *48*, p. 16476-92.
- [4] P. Comba, M. Kerscher, K. Rück, M. Starke, Bispidines for radiopharmaceuticals, *Dalton Trans.*, **2018**, *47*, p. 9202-20.
- [5] P. Comba, H. Wadepohl, S. Wiesner, Optimization of the efficiency of oxidation catalysts based on iron bispidine complexes, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2011**, *16*, p. 2610-15.
- [6] P. Comba *et al.*, Optimization of pentadentate bispidines as bifunctional chelators for  $^{64}\text{Cu}$  positron emission tomography (PET), *Inorg. Chem.*, **2013**, *52*, p. 8131-43.
- [7] N.A. Barnes *et al.*, The synthesis and structural characterisation of a series of hydrophobic piperidones and bispidones, *Eur. J. Org. Chem.*, **2008**, *6*, p. 1019-30.
- [8] T. Legdali *et al.*, Substitution-assisted stereochemical control of bispidine-based ligands, *J. Org. Chem.*, **2012**, *77*, p. 11167-176.
- [9] S. Norrehed, M. Erdélyi, M.E. Light, A. Gogoll, Protonation-triggered conformational modulation of an N,N'-dialkylbispidine: first observation of the elusive boat-boat conformer, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *11*, p. 6292-99.
- [10] J.L. Kolanowski, E. Jeanneau, R. Steinhoff, J. Hasserodt, Bispidine platform grants full control over magnetic state of ferrous chelates in water, *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, p. 8839-49.

[11] R. Gillet *et al.*, A bispidol chelator with a phosphonate pendant arm: synthesis, Cu(II) complexation, and  $^{64}\text{Cu}$  labeling, *Inorg. Chem.*, **2017**, *56*, p. 11738-52.  
 [12] A. Roux *et al.*, Bifunctional bispidine derivatives for copper-64 labelling and positron emission tomography, *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, *15*, p. 1475-83.  
 [13] T. Beyer *et al.*, A combined PET/CT scanner for clinical oncology, *J. Nucl. Med.*, **2000**, *41*, p. 1369-79.  
 [14] D. Brasse, A. Nonat, Radiometals: towards a new success story in nuclear imaging?, *Dalton Trans.*, **2015**, *44*, p. 4845-58.  
 [15] T.W. Price *et al.*, Evaluation of a bispidine-based chelator for gallium-68 and of the porphyrin conjugate as PET/PDT theranostic agent, *Chem. Eur. J.*, **2020**, *26*, p. 7602-08.  
 [16] M. Guleria, T. Das, J. Amirdhanayagam, H.D. Sarma, A. Dash, Comparative evaluation of using NOTA and DOTA derivatives as bifunctional chelating agents in the preparation of  $^{68}\text{Ga}$ -labeled porphyrin: impact on pharmacokinetics and tumor uptake in a mouse model, *Cancer Biother. Radiopharm.*, **2018**, *33*, p. 8-16.  
 [17] S.Y. Yap, T.W. Price, H. Savoie, R.W. Boyle, G.J. Stasiuk, Selective radiolabelling with  $^{68}\text{Ga}$  under mild conditions: a route towards a porphyrin PET/PDT theranostic agent, *Chem. Commun.*, **2018**, *54*, p. 7952-54.  
 [18] D. Ndiaye *et al.*, Unprecedented kinetic inertness for a  $\text{Mn}^{2+}$ -bispidine chelate: a novel structural entry for  $\text{Mn}^{2+}$ -based imaging agents, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, *59*, p. 11958-63.

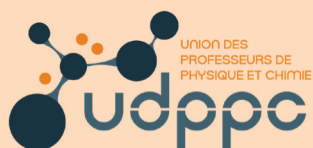
[19] C.N. Ladefoged *et al.*, A multi-centre evaluation of eleven clinically feasible brain PET/MRI attenuation correction techniques using a large cohort of patients, *Neuroimage*, **2017**, *147*, p. 346-359.

**Aline M. NONAT**,  
 Chargée de recherche au CNRS,  
 Équipe de Synthèse pour l'Analyse (SynPA),  
 Université de Strasbourg,  
 CNRS, Institut Pluridisciplinaire  
 Hubert Curien (IPHC) UMR 7178,  
 Strasbourg.  
**Elle a reçu la Médaille de bronze  
 du CNRS en 2019.**

© Nicolas BUSSEY/CNRS Photothèque.



\*aline.nonat@unistra.fr



## L'Union des professeurs de physique et de chimie

Une association d'enseignants au service des enseignants

Tous les *Bup* de 1907 à ce jour  
 en téléchargement gratuit pour toute adhésion et abonnement

Publication numérique mensuelle  
 avec impression papier trimestrielle



Consultation du *Bup* en ligne  
 par articles et par numéro avec BupDoc

- ◆ Pour tous : 1907 → 2015
- ◆ Pour les abonnés : 2016 → 2020



Un congrès organisé chaque année  
 par une académie différente



Le site : <http://www.udppc.asso.fr>

Espace Labo
Textes statutaires et documents
Gestion du laboratoire...

Espace Collège
Actualités
Journée collège UdPPC...

Espace Lycée
Programmes 2019-2021
Réforme baccalauréat 2021...

Documents thématiques
Autour de la classification périodique
Métrologie...

Siège social et courrier : 42 rue Saint-Jacques - 75005 PARIS  
 Tél. : 01 40 46 83 80 - Fax : 01 46 34 76 61 - [secretariat.national@udppc.asso.fr](mailto:secretariat.national@udppc.asso.fr)