

Pierre ERNOTTE<sup>a\*</sup>, Céline HENOUMONT<sup>b</sup>, Sophie LAURENT<sup>b,b</sup>

<sup>a</sup> Service de Chimie Générale, Organique et Biomédicale, Université de Mons, 19 Avenue Maistriau, 7000 Mons (Belgium)

<sup>b</sup> Centre de microscopie et d'imagerie moléculaire (CMMI), 8 rue Adrienne Bolland, 6041 Charleroi-Gosselies (Belgium)  
pierre.ernotte@umons.ac.be



# Développement d'un agent de contraste pour l'IRM combinant l'imagerie paraCEST et du fluor 19

## Résumé

L'imagerie médicale est un domaine primordial permettant de diagnostiquer diverses pathologies chez les patients. Il existe différents types de techniques d'imagerie et chacune possède des caractéristiques différentes. L'imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est une technique très répandue qui possède de nombreux avantages. Cependant, dans de nombreux cas, l'utilisation d'agents de contraste est nécessaire pour pallier sa faible sensibilité. De nos jours, de nombreuses recherches sont réalisées afin de développer de nouveaux agents de contraste ayant une meilleure sensibilité ou pouvant détecter un changement physiologique, tel un changement de pH, la présence d'une enzyme ou encore de certains ions. De nouvelles techniques ont été développées grâce à ces recherches, on retrouve par exemple l'imagerie paraCEST et l'IRM du <sup>19</sup>F. Dans le cadre de ce travail, un agent de contraste bimodal combinant un agent paraCEST et une molécule fluorée a été synthétisé et caractérisé. En effet, la combinaison de ces 2 techniques pourrait permettre d'améliorer la sensibilité de cet agent, ce que nous souhaitons démontrer dans cette étude.

## Abstract

Medical imaging is a key field for diagnosing various pathologies in patients. There are different types of imaging techniques and each one has

different characteristics. Magnetic Resonance Imaging (MRI) is a widely used imaging technique that has some advantages over the others. However, in many cases, the use of contrast agents is necessary to compensate for its low sensitivity. Nowadays, a lot of research is carried out in order to develop new contrast agents with better sensitivity or which can detect a physiological change, such as a change in pH, the presence of an enzyme or the concentration in certain ions. New techniques have been developed thanks to this research, such as paraCEST imaging and <sup>19</sup>F MRI. As part of this work, a bimodal contrast agent combining a paraCEST agent and a fluorinated molecule was synthesized and characterized. Indeed, the combination of these 2 techniques could improve the sensitivity of this agent, which we wanted to demonstrate in this study.

## Mots clés:

IRM, paraCEST, europium, IRM du fluor

## 1. Introduction

### 1.1. L'IRM

L'IRM est une technique d'imagerie médicale utilisée couramment dans les hôpitaux qui est basée sur l'utilisation de champs magnétiques. Elle fait partie des techniques d'imagerie les plus

utilisées dans le monde car elle possède deux grands avantages : elle est non invasive, elle ne présente donc aucun danger pour les patients et elle possède une grande résolution spatiale permettant une localisation précise de diverses pathologies. Elle se base sur les propriétés magnétiques des noyaux d'hydrogène présents dans le corps humain, provenant majoritairement de l'eau et des graisses afin de générer un contraste, et ce en tirant parti de la variation des temps de relaxation des atomes d'hydrogène en fonction de la nature des différents tissus ainsi que dans les tumeurs par exemple. Cependant, cette technique possède un inconvénient majeur, sa faible sensibilité. Elle requiert donc fréquemment l'utilisation d'agents de contraste, des composés qui sont injectés chez les patients et qui permettent d'augmenter le contraste généré dans leur environnement (ceux-ci sont utilisés dans 40-50% des analyses). Les agents les plus utilisés sont des complexes de gadolinium, tels que le Gd-DOTA (figure 1.a) [1, 2]. Ils génèrent un contraste en modifiant les temps de relaxation des molécules d'eau environnantes grâce à leurs propriétés paramagnétiques et sont couramment utilisés cliniquement. On peut par exemple observer un rehaussement du contraste au niveau du glioblastome généré par l'injection de DOTAREM\* chez une souris (figure 1.b).

## 1.2. L'imagerie CEST

La recherche tend également vers le développement d'autres familles d'agents de contraste pour l'IRM qui pourraient améliorer la sensibilité

de ces derniers ou leur permettre de détecter certains processus physiologiques. Les agents CEST (Chemical Exchange Saturation Transfer) font partie de ces nouveaux agents en développement, ils se basent sur un mécanisme d'action différent. Comme son nom l'indique, cet effet est basé sur un transfert de saturation de l'agent de contraste vers les molécules d'eau environnantes. Ce mécanisme d'échange mène à une saturation d'un grand nombre des molécules d'eau, ce qui génère une diminution du signal RMN de l'eau [3, 4]. En effet, pour rappel, un atome saturé n'apparaît pas sur un spectre RMN. Le principe de l'effet CEST est donc simple : l'agent de contraste possède des protons capables de s'échanger avec ceux des molécules d'eau environnantes, une impulsion de saturation est utilisée à la fréquence de résonance de ce proton échangeable, il est donc saturé sélectivement. Cette saturation est ensuite transférée, par un mécanisme d'échange, aux molécules d'eau (figure 2). Le proton échangeable peut être échangé de nombreuses fois avec diverses molécules d'eau, générant une importante diminution de l'intensité du pic de l'eau. Cette diminution peut être détectée *in vivo* grâce à l'utilisation des techniques d'IRM, ce qui permet la localisation de l'agent de contraste dans le corps du patient.

Pour caractériser l'efficacité de ces agents, on enregistre généralement un spectre Z, dont un exemple est montré à la figure 3. Ces spectres sont obtenus en enregistrant différents spectres RMN  $^1\text{H}$  en appliquant des impulsions de saturation à

Figure 1.a

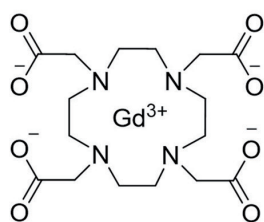


Figure 1.b

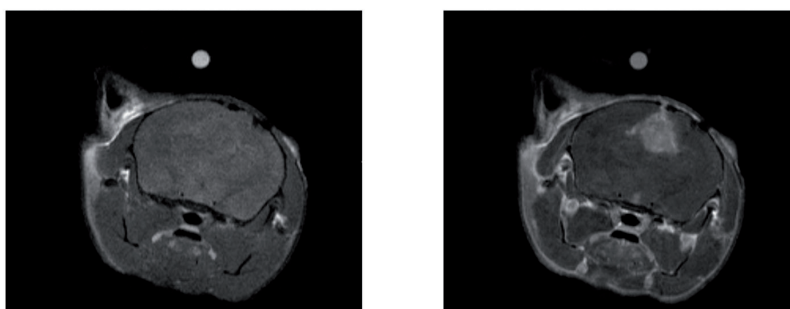


Figure 1.a : Structure du Gd-DOTA (DOTAREM\*) ; Figure 1.b : Modèle de glioblastome développé chez la souris, avant et 3 minutes après injection i.v. de Dotarem\* (100 micromoles/kg)

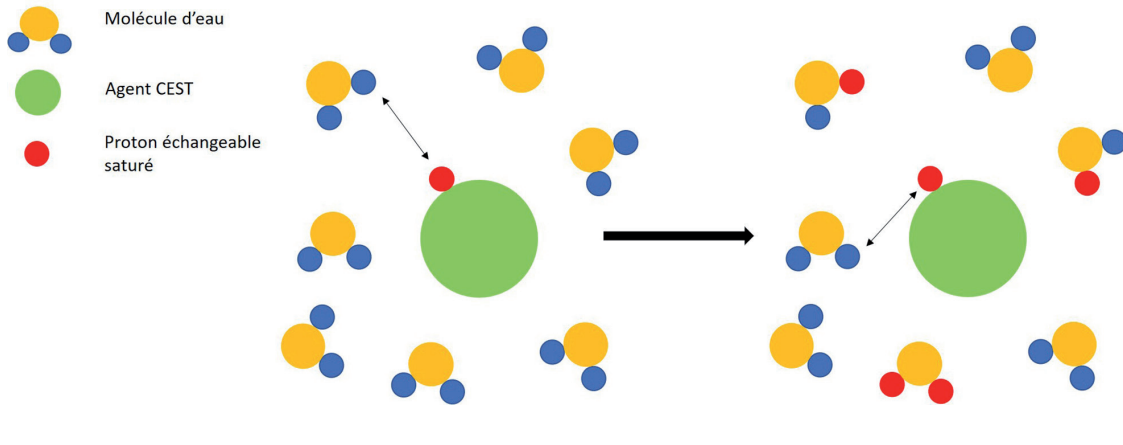


Figure 2. Mécanisme d'échange de saturation général d'un agent CEST

diverses fréquences, l'intensité du pic de l'eau étant portée en ordonnée en fonction de la fréquence de saturation. Dans le spectre résultant (figure 3), le pic à 0 ppm correspond à la saturation directe de l'eau (il ne dépend pas de la présence de l'agent CEST), l'autre pic est dû à l'effet CEST. Ce dernier est donc le pic recherché, il est spécifique de la présence de l'agent de contraste. Deux propriétés sont analysées pour déterminer l'efficacité d'un agent CEST. Premièrement, le  $\Delta CS$ , le « Chemical Shift », correspond à la différence de déplacement chimique entre les 2 pics. Il doit être aussi grand que possible car cela limite les problèmes de transferts de saturation présents *in vivo* dus aux molécules endogènes possédant un grand nombre de protons échangeables, et facilite la quantification de l'effet. Ensuite, la vitesse d'échange doit être minimisée. En effet, pour observer l'effet CEST, l'échange doit être lent sur l'échelle des temps RMN. Cela peut être quantifié selon l'équation 1, où  $k_b$  correspond à la vitesse d'échange (elle peut être exprimée en Hertz, tout comme le  $\Delta CS$ ).

$$k_b < \Delta CS$$

L'imagerie CEST possède deux avantages principaux par rapport à l'IRM protonique. Premièrement, il n'est pas nécessaire d'enregistrer une image de pré-injection. En effet, l'agent de contraste est uniquement actif lors de l'application de l'impulsion de saturation, on peut donc facilement obtenir une image classique [4]. Cela représente un gain de temps considérable lors des analyses. Enfin, on peut injecter différents agents CEST à la fois. Si la fréquence de saturation de

leur proton échangeable est différente, on peut les activer séparément, et ainsi distinguer leurs distributions [5].

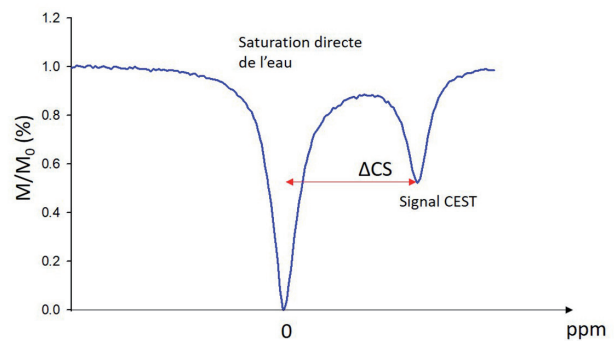


Figure 3. Spectre-Z où on observe le pic de saturation directe de l'eau à 0 ppm ainsi que le signal de l'agent CEST

Il existe différentes classes d'agents CEST, on retrouve par exemple les agents diaCEST (de petites molécules organiques possédant un proton échangeable) [6], les agents lipoCEST (des liposomes contenant un complexe paramagnétique) [7] et les agents paraCEST. Les agents paraCEST sont des complexes d'ions paramagnétiques. Ces complexes possèdent une molécule d'eau de sphère interne directement coordonnée à l'ion paramagnétique (voir figure 4), elle possède un déplacement chimique différent des autres molécules d'eau. Ces molécules de sphère interne peuvent grâce à cette propriété être saturées sélectivement sans que l'impulsion de saturation n'affecte les autres molécules d'eau. Par la suite, la saturation peut être transmise, par un mécanisme d'échange, aux molécules d'eau environnantes, générant l'effet CEST. En

effet, ces molécules possèdent un certain temps de résidence dans la sphère interne de l'ion paramagnétique, assurant la condition d'échange lent nécessaire pour générer une diminution importante du signal de l'eau.

Différents complexes ont déjà été étudiés et sont décrits dans la littérature [8,9]. Différents ligands et ions sont utilisés mais parmi les plus cités, on retrouve les dérivés d'euprium DOTAM (figure 4) [10]. En effet, il a été montré que la présence de fonctions amides sur la molécule DOTA (utilisée en IRM protonique classique) permet la réduction de la vitesse d'échange de manière drastique, ce qui permet l'apparition de l'effet CEST, car la condition d'échange lent est alors respectée. L'euprium est en outre un ion idéal car il génère un important shift du déplacement chimique de la molécule d'eau dans la sphère interne, le  $\Delta CS$  résultant est donc très grand.

### 1.3. L'IRM du fluor

L'IRM du fluor ( $^{19}\text{F}$ ) est une autre technique d'imagerie prometteuse. En effet, le noyau  $^{19}\text{F}$  possède des propriétés très similaires à celui du  $^1\text{H}$  : il possède une abondance naturelle de 100%, un spin de  $1/2$  et un rapport gyromagnétique très proche (40.08MHz/T pour le fluor et 42.58MHz/T pour l'hydrogène) [11]. Grâce à ces propriétés, le

fluor peut être imagé de la même manière que l'est l'hydrogène en IRM. Il y a peu de fluor endogène et ces atomes de fluor se trouvent au sein des os et au niveau des dents, ils sont donc immobilisés. Par ces propriétés, ces noyaux n'apparaissent pas sur une image IRM du fluor.

Cependant, on peut tirer profit de cette propriété. En effet, on peut injecter chez le patient un agent exogène possédant des atomes de fluor. Ceux-ci sont alors détectables et localisables grâce à l'IRM du fluor. Cela mène donc à un grand avantage de cette technique, il n'y a aucun bruit de fond, ce qui permet une localisation plus aisée du contraste généré. Un autre avantage de cette technique est que les sondes IRM qui permettent de détecter ce contraste peuvent facilement être configurées de l'hydrogène vers le fluor, ou l'inverse. L'IRM du  $^1\text{H}$  permet d'obtenir une image anatomique, qui permet d'observer les différents organes. Une superposition de celle-ci avec l'image du fluor permet alors de mieux localiser le contraste généré, et cela peut se faire très rapidement.

Malgré cela, l'IRM du  $^{19}\text{F}$  est relativement peu sensible, différents systèmes sont étudiés afin d'augmenter la sensibilité de cette technique. Une solution est d'utiliser des molécules possédant de nombreux atomes de fluor [12]. Par exemple, des

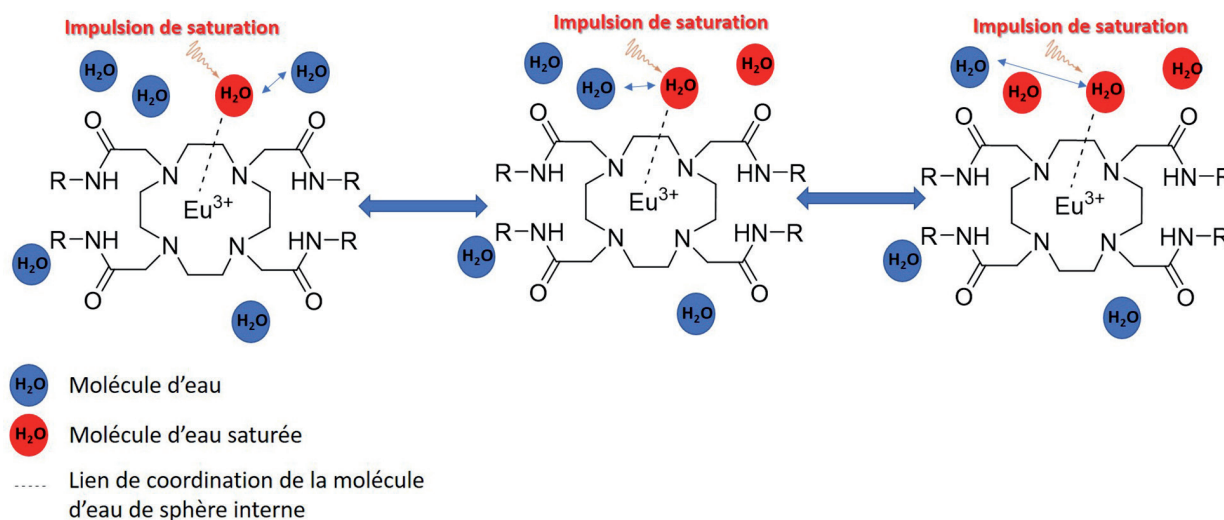


Figure 4. Mécanisme d'échange de saturation général d'un agent paraCEST

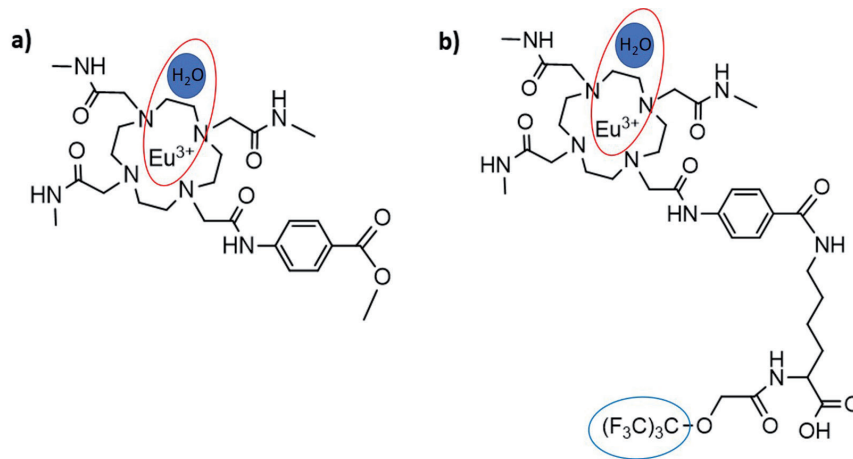


Figure 5a. Structure de l'Eu-DO3AM ; Figure 5b. Structure du composé bimodal paraCEST- $^{19}\text{F}$

nano-émulsions de perfluorocarbones font partie des systèmes les plus étudiés (« oil in water nano-emulsions »). Ces systèmes permettent d'obtenir une grande densité d'atomes de fluor malgré leur faible solubilité dans l'eau. Ils sont stabilisés par une couche de lipides.

Une autre technique étudiée pour améliorer sa sensibilité est de diminuer les temps de relaxation du fluor [13]. En effet, cela permet l'utilisation de séquences appelées « ultrafast ». L'objectif est de réaliser un plus grand nombre d'acquisitions en un temps limité, cela augmente ainsi l'intensité du signal détecté. Pour diminuer ces temps de relaxation, une technique est de faire interagir des atomes de fluor avec des ions paramagnétiques, comme des lanthanides par exemple. Il a été démontré que cette interaction peut être réalisée grâce à un agent bimodal, en combinant un complexe paramagnétique classique (généralant un contraste en IRM du  $^1\text{H}$ ) avec un agent fluoré. En effet, les auteurs ont observé une augmentation significative de la sensibilité générée pour l'IRM du  $^{19}\text{F}$ , le complexe était également toujours actif en IRM protonique.

## 2. Objectif de cette étude

Dans le cadre de ce mémoire, nous voulions observer le même phénomène mais en combinant l'IRM du  $^{19}\text{F}$  non pas avec l'IRM protonique mais avec l'imagerie paraCEST. En effet, cette

dernière requiert également l'utilisation d'ions paramagnétiques qui peuvent donc également réduire les temps de relaxation du fluor. Cela permet ainsi d'augmenter la sensibilité de l'IRM du  $^{19}\text{F}$  par une combinaison avec une nouvelle technique. De plus, l'agent bimodal obtenu combinera les avantages des deux techniques, précédemment citées.

Pour réaliser cela, un dérivé de DO3AM (figure 5a), un agent fortement étudié dans le domaine de l'imagerie IRM, a été choisi comme agent paraCEST. Une molécule fluorée a ensuite été greffée afin d'obtenir un agent bimodal paraCEST/ $^{19}\text{F}$  (figure 5b). Ce composé possède 9 atomes de fluor équivalents, ce qui permet d'avoir un signal intense.

## 3. Résultats

Le dérivé d'Eu-DO3AM (figure 5.a) a d'abord été synthétisé et sa structure a été caractérisée par RMN et par spectrométrie de masse. Ce composé possède une très bonne solubilité dans du PBS à pH 7,2 (un tampon mimant les conditions physiologiques), une concentration maximale de 31mM a été mesurée. Il montre des propriétés CEST très intéressantes. En effet, sur les spectres-Z enregistrés à 600 MHz, un pic intense est observé à 50 ppm, comme espéré. L'intensité de cet effet diminue lorsque la température augmente mais l'intensité reste

suffisante à 37°C, l'agent de contraste pourrait ainsi être observé *in vivo* (figure 6).

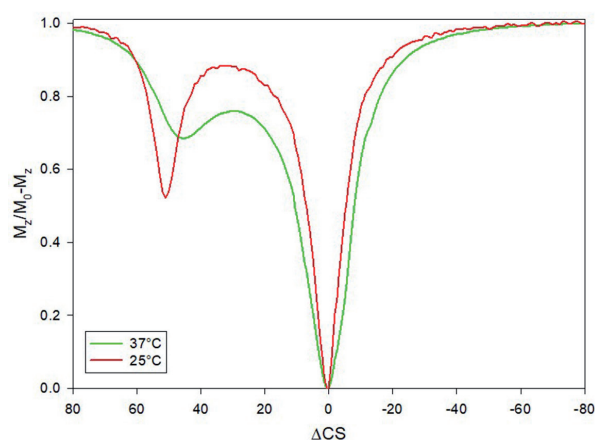


Figure 6. Spectres-Z de l'Eu-DO3AM enregistés à un champ de 600MHz, en utilisant une impulsion de 659Hz. L'échantillon est préparé dans du PBS à pH 7,2, à une concentration de 31mM

Le composé bimodal (figure 5.b) a ensuite été développé. Cet agent possède un inconvénient très important : sa solubilité dans l'eau est très faible. En effet une concentration maximale de 0.25 mM a été mesurée dans le PBS à pH 7,2, ce qui est très faible. Cela est dû au caractère hydrophobe des atomes de fluor. De ce fait, l'effet CEST généré par cet agent est peu intense. Il est observable dans le PBS mais serait difficilement détectable *in vivo*. Cependant, la vitesse d'échange de la molécule d'eau de sphère interne a été mesurée et il s'agit bien d'un échange lent. Ses propriétés CEST restent donc tout autant intéressantes.

Finalement, des mesures de relaxation du  $^{19}\text{F}$  ont été réalisées à 25°C et 500 MHz. Le composé bimodal montre bien une diminution des temps de relaxation par rapport à des molécules fluorées classiques. En effet, le temps de relaxation transversal a été divisé par 4, ce qui permettrait, grâce à l'utilisation de séquences « ultra-fast » d'augmenter la sensibilité en IRM du fluor.

#### 4. Conclusion et perspectives

Le dérivé d'Eu-DO3AM (figure 5.a) possède de très bonnes propriétés aussi bien au niveau de sa solubilité que de son efficacité en imagerie

paraCEST. Ces résultats sont donc encourageants pour un développement plus poussé.

Cependant, l'utilisation du complexe bimodal est fortement limitée par sa faible solubilité, un paramètre primordial *in vivo*. Par la suite, la solubilité de cet agent pourra être augmentée par l'introduction de fonctions carboxylates au niveau des bras amides, ce qui devrait faciliter son utilisation.

Une autre perspective qui sera étudiée est le greffage de ce complexe sur des nanoparticules de silice. En effet, cela permettra d'augmenter la densité du complexe en un endroit, ce qui devrait augmenter sa sensibilité. De plus, cela devrait diminuer les temps de relaxation du  $^{19}\text{F}$  de manière plus importante, ce serait une autre façon d'améliorer la sensibilité de l'agent.

#### Références

- [1] Caravan P.; *Chem Soc Rev.* **2006**, 35, 512-523.
- [2] Terreno E.; Castelli D. D.; Viale A.; Aime S.; *Chem Rev*, **2010**, 110, 3019-3042.
- [3] McMahon M. T.; Gilad A. A.; *Top Magn Reson Imaging*, **2016**, 25, 197-204.
- [4] Vinogradov E.; Sherry A. D.; Lenkinski R. E.; *J. Magn. Reson*, **2013**, 229, 155-172.
- [5] McMahon M. T.; Gilad A. A.; Deliso M. A.; Berman S. M. C.; Bulte J. W. M.; Van Zijl P. C. M.; *Magn Reson. Med*, **2008**, 60, 803-812.
- [6] Song X.; Walczak P.; He X.; *J. Cereb. Blood Flow Metab*, **2016**, 36, 1186-1194.
- [7] Ferrauto G.; Castelli D. D.; Di Gregorio E.; Terreno E.; Aime S.; *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*, **2016**, 8, 602-618.
- [8] Viswanathan S.; Ratnakar S. J.; Green N. K.; *Angew. Chem. Int. ed*, **2009**, 48, 9330-9333.
- [9] Castro G.; Regueiro-Figueroa M.; Esteban-Gómez D.; *Chem. Eur. J.*, **2015**, 21, 18662-18670.
- [10] Zhang S.; Winter P.; Wu K.; Sherry A. D.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 1517-1518.
- [11] Hequet E.; Muller R.; Laurent S.; *Futur Chem. Med*, **2019**, 11, 1157-1175.
- [12] Tirota I.; Dichiarante V.; Pigliacelli C.; *Chem. Rev*, **2015**, 115, 1106-1129.
- [13] Chalmers H.; De Luca E.; Hogg N. H. M.; *Chem. Eur. J.*, **2010**, 16, 134-148.